AGRONOMIA LUSITANA

VOL. 8 — N.º 4

1946

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
5 - JUL 1949

ESTAÇÃO AGRONÓMICA NACIONAL

QUINTA DA ALDEIA - SACAVÉM

PORTUGAL

AGRONOMIA LUSITANA

VOL. 8 — N.º 4

1946

Estação Agronómica Nacional

PORTUGAL

Composição e impressão das Oficinas
da Tip. Alcobacense, Lt.— Alcobaça

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO CITOLÓGICO DOS ESPELTOIDES DO TIPO *γ*

POR *A. CÂMARA* E *CÂNDIDA RODRIGUES*
(Estação Agronómica Nacional)

I

COMO é sabido, os espeltoides classificam-se, segundo NILSSON-EHLE (1921), em 3 categorias, A, B e C, conforme os tipos de disjunção dos seus heterozigóticos. Os espeltoides A segregam plantas normais, espeltoides heterozigóticos e espeltoides homozigóticos, em proporções que vão desde 1:2:1 até quase 1:1:0. Os espeltoides B originam disjunções de 1 N: 4 a 5H, com poucos ou mesmo ausência total de espeltoides homozigóticos. E, finalmente, os espeltoides C submetem-se a segregações de 1 N: 1 H, com raros ou nenhuns espeltoides homozigóticos.

Compreende-se que, por vezes, possa haver dificuldade na distinção dos tipos A e C, quando aqueles se aproximam da segregação limite de 1:1:0. Por isso, HUSKINS e os seus colaboradores (1946) só tomam, como espeltoides do tipo A, os que dão descendência espeltoide apreciável, de vigor quase normal, e do tipo C os que produzem plantas normais e heterozigóticas sensìvelmente na mesma proporção, com raros ou nenhuns espeltoides homozigóticos.

Claro que esta classificação é meramente convencional e segundo toda a verosimilhança a diversidade entre os tipos A e C consiste apenas em diferenças de grau.

Como é igualmente sabido, parece estar demonstrado, pela série já considerável de contribuições, fornecidas por numerosos genetistas e citologistas, que o cromosoma que transporta os genes inibidores dos caracteres «aristado» e «espeltoide», que se costuma chamar *C* — o cromosoma *IX* na terminologia de SEARS (1941) — é o responsável pela produção de espeltoides.

Como os símbolos usados por NILSSON-EHLE para os espeltoides A, B e C se confundem com os símbolos dos cromosomas e dos

genomios do Trigo, preferimos adoptar, para os mesmos tipos de espeltoides, as designações de HUSKINS, α, β e γ.

Lembrando as conclusões recentemente apresentadas por HUSKINS, na sua excelente revisão sobre espeltoides (1946), poderemos dizer que, presentemente, se atribue a origem dos tres tipos de espeltoides aos fenómenos seguintes:

1. Os espeltoides α são originados por genovariações ou pequenas deficiências no cromosoma *C*.
2. Os espeltoides β resultam ou da perda dos dois cromosomas *C*, ou da perda dum único cromosoma *C*, ou ainda da perda dum cromosoma *C* e do braço mais pequeno do outro *C*.
3. Os espeltoides γ provêm da perda de uma extensão considerável do cromosoma *C*.

Segundo HUSKINS (1946), os espeltoides β heterozigóticos representar-se-iam por $20_{II} + C$ ou $20_{II} + Ctl$, sendo *Ctl* o símbolo para o braço telomitico mais comprido do cromosoma *C*. Os homozigóticos β, evidentemente, têm representação simples 20_{II}, pois são os de 40 cromosomas, isto é nulisómicos para o cromosoma *C*. Os espeltoides do tipo γ representar-se-iam, segundo HUSKINS:

$$\text{para os homozigóticos, por....} \begin{cases} 20_{II} + Cd + Cd \\ 20_{II} + Cts + Cts \end{cases}$$

$$\text{para os heterozigóticos, por....} \begin{cases} 20_{II} + C + Cd \\ 20_{II} + C + Cts \end{cases}$$

indicando o símbolo *Cd* um cromosoma *C* com deficiência considerável e o símbolo *Cts* o braço telomítico mais curto do cromosoma *C*.

Considera-se facto demonstrado que menos do que duas séries de genes inibidores de «espeltoide» formam tipos espeltoides e mais do que duas séries produzem tipos compactoides.

Tem-se mais, como provado, que os genes para a inibição dos caracteres espeltoide e aristado estão localizados no braço mais longo do cromosoma *C*.

Esquemàticamente, poderemos apresentar os vários tipos de

variações espeltoides, conhecidos até ao presente, pelo gráfico da figura 1.

O cromosoma C, no processo de formação de espeltoides, poderá, portanto, sofrer roturas em vários pontos. A figura 2 indica alguns desses *loci*, pelas setas 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

Segundo a terminologia de HUSKINS, com estas roturas, originar-se-ão os cromosomas seguintes:

Roturas 1 e 2 ..... cromosoma *Cd*
Rotura 3 ..... cromosoma *Cts*
Rotura 4 ..... isocromosoma *Cil*
Rotura 5 ..... cromosoma *Ctl*

Conquanto estes símbolos de HUSKINS sejam claros e simples, parece que há necessidade, para melhor e mais completa descrição dos vários tipos de espeltoides, de introduzir alguns aditamentos às referidas representações. Em primeiro lugar, há conveniência em distinguir as roturas nos dois braços do cromosoma *C*. Assim chamaremos *Cdl* quando a deficiência se verifica no braço mais longo e *Cds* quando se der no braço mais curto. Em relação ao maior braço, também se nos afigura ser vantajoso distinguir os cortes 1 e 2, isto é, o N.º 1, que dá o rompimento deixando ainda intacto o segmento cromosómico com os genes inibidores de «espeltoide» e «aristado» e o N.º 2 que já retira do cromosoma os referidos genes. Por isso preferimos introduzir mais as representações Cd_1l e Cd_2l.

Depois, parece que poderá haver roturas no braço mais curto do cromosoma C, isto é, segundo a seta 6. Portanto, julgamos conveniente adoptar a representação *Cds* para o cromosoma resultante de tal deficiência. Por último, cremos que além do símbolo *Cil* deve registar-se também o *Cis*, pois o corte do centrómero originará não só isocromosomas *Cil*, que cita HUSKINS, mas também os *Cis* — isocromosomas dos braços mais curtos.

Sabe-se que a mutação espeltoide envolve pelo menos dois genes, ou mais provàvelmente dois complexos de genes, afectando os caracteres das glumas e das aristas, que se encontram afastados de 30 a 40 unidades de *crossover*.

Observando o esquema da fig. 1, que resume o estado actual dos nossos conhecimentos, nesta matéria, qualquer deficiência de

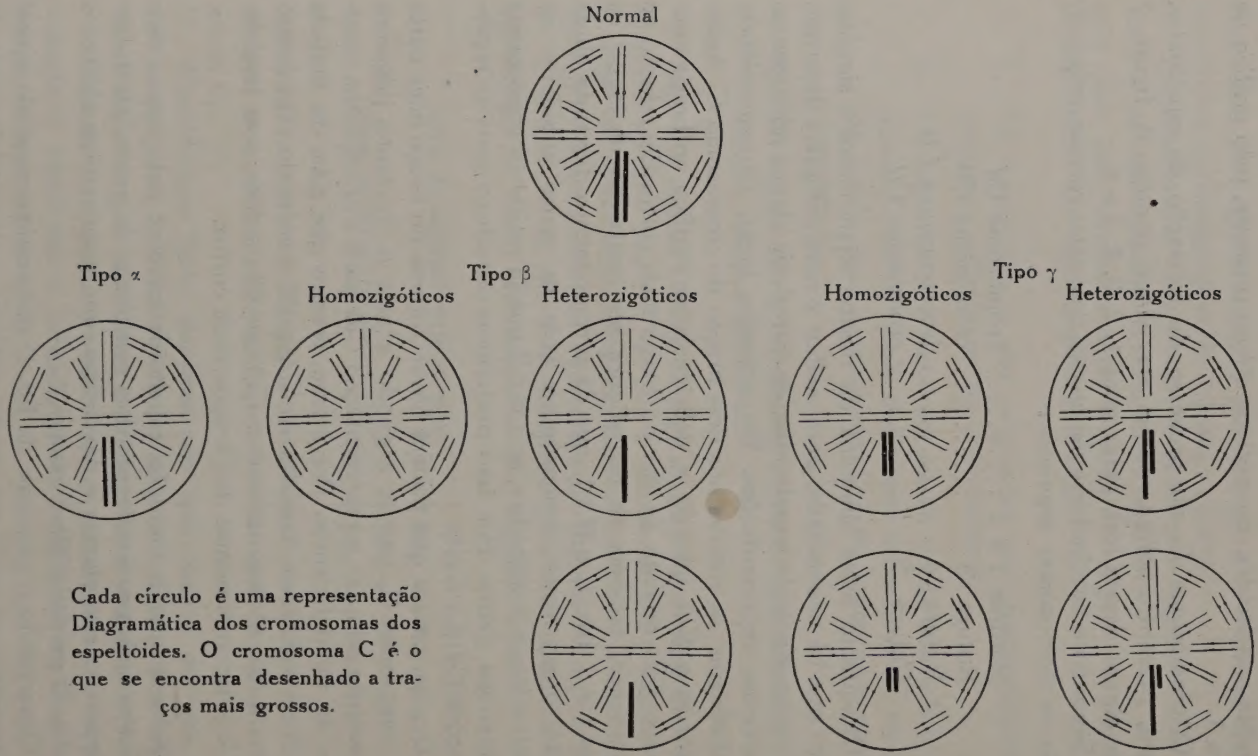


Fig. 1

Representação esquemática de vários tipos de espeltoides.

certa importância — no braço mais longo do cromosoma *C* — e bastará verificar-se num único cromosoma, produz espeltoides do tipo γ.

Pelo mesmo critério, parece que se o corte se efectuasse no centrómero, segundo a seta 4, (fig. 2), isto é, se se desse uma

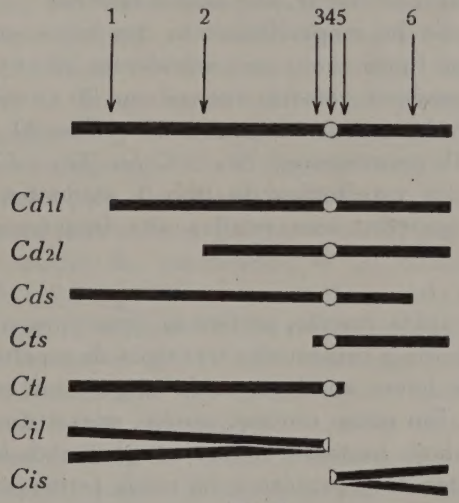


Fig. 2

misdivisão, ainda se poderiam formar espeltoides. Estes seriam evidentemente os que transportassem o cromosoma *Cis*. Conquanto ainda se não tenham descrito estes tipos, apontando-se apenas a presença de cromosomas *Cil* nos compactoides, sub-compactoides e subnormais (HUSKINS, 1946) afigura-se-nos que a possibilidade da sua ocorrência não deve esquecer-se.

Sem dúvida, as sucessivas contribuições trazidas ao problema dos espeltoides esclarecem em muito a sua origem. Basta analisar as representações de HUSKINS, atrás referidas e esquematizadas na nossa fig. 1, para nos parecer logo muito clara e compreensível a produção dos vários espeltoides.

Justifica-se também, com facilidade, o fenómeno da transformação de certos tipos de espeltoides, como por exemplo o caso bem conhecido da conversão frequente dos espeltoides do tipo γ em espeltoides do tipo β e em plantas normais.

Claro que um trigo que seja $20_{II} + C + Cd$ deverá produzir, como realmente acontece, gametas $20 + C$ e $20 + Cd$, desde que

os cromosomas *C* e *Cd* emparelhem normalmente. Verifica-se, no entanto, que os grãos de pólen $20 + Cd$ se desenvolvem lentamente, pelo que a fecundação efectuada por eles é rara. Assim, as associações, num zigoto, dos dois cromosomas *Cd* são excepcionais. Tem-se reconhecido demais que as plantas $20_{II} + Cd + Cd$, quando chegam a formar-se, são anãs e estéreis.

Quando não há emparelhamento dos cromosomas *C* e *Cd* e quando por isso funcionam como univalentes, dá-se um segregação irregular, formando-se gametas apenas com 20 cromosomas. Desta maneira, fundindo-se com um gameta $20 + C$ ou $20 + Cd$ originam formas com 41 cromosomas, $20_{II} + C$ ou $20_{II} + Cd$, que são as constituições dos espeltoides do tipo β, evidentemente heterozigóticos, que aparecem com relativa alta frequência a partir dos espeltoides γ.

Por esta rápida revisão, poderá supôr-se que, uma vez que se encontra explicada a origem dos tres tipos de espeltoides, já pouco interesse pode haver em levar mais longe o seu estudo genético ou citológico. Em nosso critério, porém, apesar dos horizontes se apresentarem hoje bastante claros, na generalidade dos aspectos mais importantes deste problema, há ainda certos pontos obscuros, que conviria atacar.

Não conhecemos, por exemplo, qual o papel das translocações no processo do fabrico natural de espeltoides. Dizemos que pode haver roturas nos cromosomas *C* com perdas de fragmentos mais ou menos importantes. Mas não sabemos, exactamente, se esses segmentos se perdem na totalidade ou em parte, ou se se vão inserir noutros cromosomas. Ignoramos também se o cromosoma *C* funciona algumas vezes de receptor de segmentos fornecidos por outros cromosomas. Desconhecemos ainda hoje se se confirma a existência de «efeitos de posição», como pretendemos, há 10 anos atrás (CÂMARA, 1936), que podem originar espeltoides sem que haja delecções visíveis.

Está já razoàvelmente bem estudada a fragmentação do cromosoma *C*. Mas o que sucede ao cromosoma *B* — como habitualmente se denomina — esse cromosoma que transporta os genes para «aristado» e «espeltoide», encontra-se ainda por investigar.

Sabemos, pelas contribuições de SEARS (1944), que os cromosomas II e XX, indicados nos seus nulisómicos, transportam os

genes promotores do desenvolvimento das aristas. Um destes cromosomas pode ser o que se tem chamado *B*, cujos factores são capazes, como referimos, de originar o caracter espeltoide. Temos como assente que êsses genes não se revelam habitualmente, porque no cromosoma *C* existem os seus inibidores; e só quando eles se perdem, por deficiência parcial ou total do cromosoma, é que o carácter espeltoide se revela. Mas ocorre perguntar o que sucederia se ocorresse no cromosoma *B* uma duplicação. E é muito provável, do mesmo modo que existem cromosomas *Cil* que originam compactoides, subcompactoides ou subnormais, possa haver também cromosomas *Bil* ou *Bis*, conforme a localização dos genes responsáveis pelo caracter «espeltoide».

Enfim, basta referir estes dois assuntos (1) papel das translocações na produção de espeltoides, e (2) comportamento do cromosoma *B*, para logo se ver que existem ainda problemas que aguardam solução. E além destes há muitos outros, gravitando em torno do cromosoma *C*, que conviria investigar com mais profundidade. Decididamente, há que concluir que o assunto está longe de poder considerar-se esgotado. As coisas não parecem tão singelas como se deduzia da revisão anteriormente feita.

Por esta razão, julgámos útil empreender o estudo citológico de alguns trigos espeltoides, provenientes de várias origens, tomados como sendo do tipo γ, por darem sempre segregações de 1 N: 1 H, com raros indivíduos espeltoides homozigóticos.

II

As primeiras observações citológicas dos espeltoides do tipo γ, que tivemos ensejo de fazer, mostraram logo que todos eles eram de 42 cromosomas e que, na maioria dos casos, um ou dois cromosomas haviam sofrido forte delecção nos braços mais longos, apresentando-se frequentemente não emparelhados, nas metafases da divisão redutora.

Verificou-se mais que. sempre um espeltoide γ se convertia num tipo ♂, este era de 41 ou 40 cromosomas.

As nossas primeiras observações, portanto, confirmaram as realizadas anteriormente por numerosos investigadores, reforçando as últimas conclusões revistas por HUSKINS (1946).

Ulteriores estudos nossos vieram revelar, no entanto, alguns

factos curiosos, por mostrarem que aparecem constituições de espeltoides do tipo γ, diversas das atrás referidas, que existem processos de formação de espeltoides, diferentes dos que até agora se tem admitido; e que ainda há certas características dos cromosomas, envolvidos no processo de produção de espeltoides, que podem despertar interesse na discussão destas anomalias.

Algumas dessas observações expõem-se seguidamente.

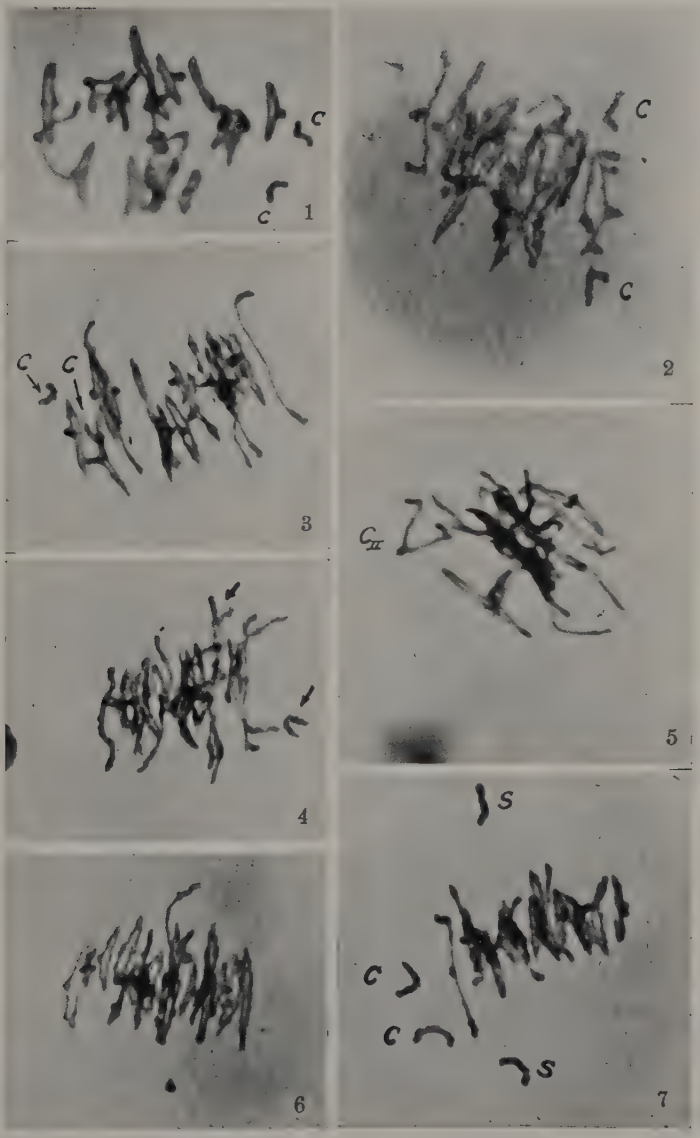
Em muitos casos de espeltoides γ, homozigóticos, ao lado de 20 bivalentes normais, vê-se um par de cromosomas não emparelhados, com dissemos, de dimensões acentuadamente menores que as habituais (foto 1). A medição destes cromosomas mostra que eles muitas vezes não são de igual comprimento, o que prova haverem sofrido delecções de extensão diferente. Aparentemente, a razão do seu não emparelhamento provinha justamente de ambos os braços dos citados cromosomas terem perdido zonas importantes.

Parece digno de nota que, em casos como os da foto 1, os centrómeros dos univalentes — cromosomas que temos tomado como sendo os cromosomas C — se encontram com actividade diminuida. Na verdade, nessa metafase, vêm-se os cromosomas com os centrómeros mal orientados. Coisa idêntica se observa nas fotos 2, 3 e 4. Na 2, sobretudo, a demonstração é mais evidente, pois os cromosomas C dispõem-se exactamente ao contrário da posição que deveriam tomar, como se os seus centrómeros não agissem ou agissem com fraca intensidade.

Os dois cromosomas não emparelhados mantêm-se indolentemente na região equatorial, nas anafases atrazadas (foto 8), provàvelmente, porque têm os seus centrómeros parcialmente inactivados, e até nas anafases adiantadas (foto 17, 20), pelo que se compreende a facilidade com que podem dar-se segregações irregulares e com elas a conversão dos espeltoides γ em espeltoides β.

Quando se inicia a separação dos bivalentes, pode analizar-se melhor a configuração desses cromosomas *C*. Principiam por se manter afastados, dispondo-se como se não tivessem centrómeros a comandá-los, não sofrendo por isso qualquer inflexão (foto 8); depois, à medida que os cromosomas normais se separam, caminhando para os polos, aqueles cromosomas C são arrastados, num movimento contrário, para a parte central, como se não tivessem qualquer parte activa na formação do fuso (foto 17).

Algumas vezes, em determinadas linhas de espeltoides homo-


C
C
1
C
C
2
C
C
3
C
4
C
5
S
C
C
S
6
7

zigóticos γ, esses cromosomas C apresentam-se normalmente emparelhados. Distinguem-se, porém, dos outros bivalentes devido às suas dimensões, pelo menos na fraca extensão dum dos braços. Nas profases adiantadas, quando é ainda possível observar com nitidez graus de emparelhamento, pode ver-se esse par de cromosomas com aspectos curiosos. E parece não haver dúvida que tal par é o *C*, visto que é o único claramente afectado.

Como se pode verificar na foto 5, esses cromosomas apresentam, do lado não emparelhado, braços excessivamente curtos e do outro, perfeitamente associados, braços muito mais compridos que os usuais. Em alguns casos, é possível, ver que não obstante haja emparelhamento, um dos cromosomas é mais longo no braço mais comprido que o outro.

Apesar desse emparelhamento, os cromosomas são extranhos, evidenciando a mesma diminuição de actividade dos centrómeros, a que temos aludido.

Nem sempre a variação encontrada nos espeltoides γ se limita a um único par de cromosomas. Bastantes vezes se pode ver a não associação de dois pares (foto 7). Um par deve ser o dos cromosomas *C*. Quanto ao outro, poderemos chamar-lhe *S*, por estar relacionado aos espeltoides. Mas pode suceder perfeitamente que ele seja o par de cromosomas *B*.

Estes cromosomas parece haverem sofrido também variações estruturais, pois mostram-se muitas vezes com um braço consideràvelmente reduzido e o outro excessivamente longo, como se tivesse recebido, por translocação, segmento ainda relativamente importante.

Nas metafases atrazadas pode notar-se melhor que este segundo par alterado sofreu evidentemente translocações. Quando surge este segundo par não emparelhado, parece que as perturbações são mais profundas do que se pode ajuizar pelo exame das metafases da divisão redutora. Com efeito, as anafases apresentam-se então muito alteradas, havendo sempre um certo número de cromosomas que não passam para os polos (foto 19 e 20).

Outro facto que não se tem apontado nos espeltoides e que possìvelmente tem grande importância, é a presença de isocromosomas. HUSKINS (1946) menciona-os nos compactoides, subcompactoides e subnormais, como dissemos, mas não se refere à sua presença em qualquer tipo de espeltoides. A existência dum cro-

mosoma *C* com extremos duplicados, já era citada por HAKANSSON (1930, 33) como sendo responsável pela produção dos tipos «compactoides». E mais tarde vários autores, entre eles UCHIKAWA (1937), observavam que esse cromosoma «produtor de compactoides», era composto do braço mais longo do cromosoma *C* duplicado. Este cromosoma duplicado, que HUSKINS classifica de isocromosoma — representando-o por *Cil* e desenhando-o esquemàticamente como se proviesse duma misdivisão — quando não emparelhado com o cromosoma C normal, emparelha os seus dois braços duplicados, formando quiasmata e aparecendo assim como se fosse um bivalente de menores dimensões.

Conquanto nenhum dos autores, que nos precederam, se refira ao papel dos isocromosomas nos espeltoides, tivemos ensejo de os observar, com relativa frequência, em algumas linhas de espeltoide γ.

Por via de regra, aparecem como se fossem uns pequenos bivalentes (fotos 12, 14, 15 e 16) não congregados.

À primeira vista cuida-se que tem um quiasma terminal e outro intersticial. Olhando com mais cuidado se reconhece que o ponto tomado como quiasma terminal é o centrómero.

Estes isocromosomas podem derivar de qualquer cromosoma, como é intuitivo, mas uma vez que aparecem especialmente nos espeltoides é natural que resultem dos cromosomas C. Também é crível que tanto apareçam os isocromosomas de braços compridos como os de braços mais curtos. Se a misdivisão é o processo mais compreensível de gerar o isocromosoma, como propôs UPPCOTT (1937), então compreende-se que, em teoria, se podem formar dois isocromosomas, por cada corte do centrómero, um *Cil* — do braço mais longo — e outro *Cis* — do braço mais curto. É de prever que o primeiro daria tipos compactoides — por haver duplicação dos genes inibidores de «espeltoide» — e o segundo espeltoide por deficiência desses mesmos genes.

Uma vez que o cromosoma *B* é portador dos genes responsáveis pelos caracteres espeltoide e presença de aristas — que os genes do cromosoma C inibem — também seria de prever que a misdivisão deste cromosoma poderia dar variações. Um cromosoma *Bil* ou *Bis* — conforme a localização dos genes referidos — originaria tipos espeltoides, mesmo que o cromosoma C não fosse afectado por nenhuma delecção. Na verdade, sabe-se que uma dose de genes inibidores impede a revelação do caracter espeltoide,

quando para ele só existe também uma simples dose de genes. Desde que estes aparecessem duplicados — consequência da formação do isocromosoma *Bil* ou *Bis* — era já crível que os indivíduos aparecessem espeltoides.

As nossas observações não provam definitivamente que existam tipos espeltoides, resultantes da presença destes isocromosomas *Bil* ou *Bis*. Mas a presença bastante frequente de isocromosomas, em alguns espeltoides de tipo mais extremo, aconselha a que não se arrede esta hipótese.

Analisando separadamente esses espeltoides mais salientes, de caracteres mais fortemente marcados, verificamos que quase sempre apresentam, além dos dois cromosomas *C* não emparelhados, com delecções, um isocromosoma. É o que se pode observar na foto 10.

Em outros espeltoides do tipo γ, os cromosomas C mostram-se intactos, notando-se então o aparecimento dum isocromosoma longo e dum univalente. Claro que este isocromosoma não pode provir dos cromosomas C. Porque se fôsse, as plantas observadas, em vez de espeltoides, seriam compactoides, uma vez que o isocromosoma se mostra derivando dum braço longo. Assim há que concluir que tanto o isocromosoma como o univalente encontrado nada têm que ver com os cromosomas C. Mas também se os cromosomas C não são afectados, como pode surgir o caracter espeltoide?

Desde que nestes mutantes existe um isocromosoma é natural tomá-lo como responsável do aparecimento do caracter espeltoide. Então perguntar-se-ia qual poderia ser o cromosoma, cuja duplicação originava a mutação que estamos a discutir. Evidentemente parece que só o cromosoma, a que se tem convencionado chamar *B*, que contém os genes para aristado e espeltoide, poderia dar esse efeito.

Se assim é, se a condição espeltoide resulta deste isocromosoma e não é provocada por qualquer condição que não conseguissemos averiguar, inclusivé por deficiências imperceptíveis nos cromosomas *C*, poderiamos então dizer que há espeltoides γ com a representação seguinte:

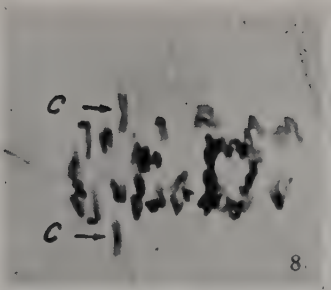
$$19_{II} + CC + B\ Bil$$

sendo *Bil* a representação do isocromosoma proveniente da duplicação do braço mais longo do cromosoma *B*. Parte-se, evidentemente, do princípio que é no braço mais longo que está localizado o gene «espeltoide» visto que o isocromosoma é dum braço longo.

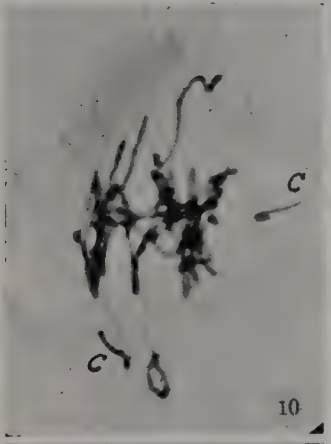
Em certas linhas de espeltoides, aparecem com frequência trivalentes e quadrivalentes. O facto já foi relatado variadas vezes. WINGE, em 1924, e HUSKINS, em 1927, 1928, aludiram ao aparecimento ocasional de associações deste tipo. E, depois, vários citogenetistas têm mencionado a existência de quadrivalentes e trivalentes, em espeltoides homozigóticos e heterozigóticos.

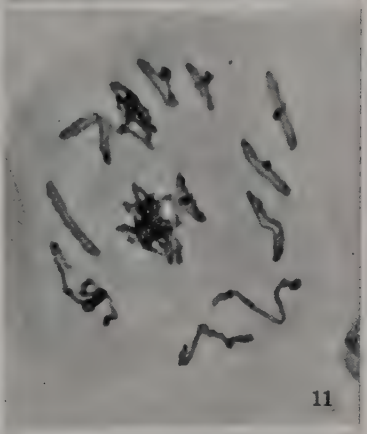
No material, que estudámos, encontrámos um número avultado de associações plurivalentes. Algumas vezes, além dos quadrivalentes, observavam-se trivalentes nas mesmas células (foto 13). Quando era possível estudar diplotenas e diaquineses, a observação desses quadrivalentes e trivalentes, seguindo com atenção os segmentos emparelhados, indicava claramente que se haviam dado translocações recíprocas. (foto 16). Outras vezes os cromosomas associados são de dimensões diversas (foto 11). Facto igualmente curioso era os cromosomas não emparelhados, esses univalentes que temos interpretado como cromosomas *C*, denotarem diferenças sensíveis de extensão. A diversidade que se observa, por vezes, é tão manifesta que chegamos a duvidar que os dois cromosomas *C* provenham do mesmo par. Claro que essa grande diversidade poderia atribuir-se apenas à circunstância de que um cromosoma sofresse uma delecção enquanto o outro permanecia intacto. Mas a verdade é que o cromosoma mais longo se apresenta, nesses casos, bastante mais longo do que é corrente, tendo de se admitir, portanto, que experimentou uma translocação, funcionando de receptor para um segmento qne veio de qualquer outro cromosoma.

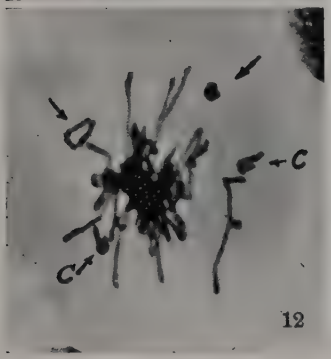
Deste modo, a nosso ver, pelo que nos foi dado examinar, as variações estruturais que experimentam os cromosomas dos espeltoides do tipo γ não se limitam a simples deficiências. As translocações nos espeltoides já haviam sido referidos por nós, em trabalho anterior (CÂMARA, 1936). E àcerca do aparecimento relativamente frequente de espeltoides em descendências de cruzamentos com *Triticum sphaerococcum*, vários autores se pronunciaram a favor das translocações (ELLERTON, 1939, CÂMARA, 1946). Há, sem dúvida translocações diversas, intercâmbios segmentários, e até inversões.

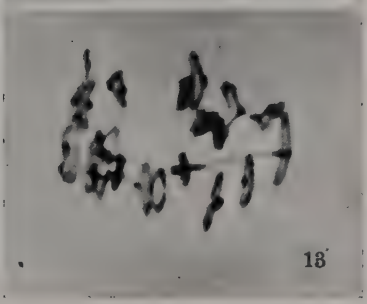

C
C
8

9


C
C
10


11


C
C
12


13

Não é caso extremamente excepcional, aparecerem, por exemplo, pontes anafásicas (foto 18).

Observaram-se várias provas de se haverem dado translocações recíprocas. Além da produção banal de quadrivalentes e trivalentes, pode notar-se o aparecimento de bivalentes de dimensões extremas, um muito pequeno e outro muito grande (foto 9) que evidentemente não podem ser normais.

Decerto é difícil realizar uma investigação metódica sobre os tipos de translocação que se podem efectuar. O conhecimento citogenético do Trigo ainda não é suficiente, para que um tal trabalho se efectuasse com pleno êxito.

Por enquanto, apenas poderemos tentar algumas aproximações a este problema.

Dentro do nosso material, de plantas cujo comportamento pareceu diferente do justificado pelas alterações no cromosoma *C*, decidimos contar, no maior número possível de células com arranjos claros, os vários tipos de associação, enumerando também os casos em que os bivalentes telosindéticos eram superiores a 2, média observada nas plantas normais.

Os resultados, deduzidos de 462 células, foram os seguintes:

		Número total observado	Percentagem
Associações	$19_{II} + 1_{IV}$	31	6,7 %
	$19_{II} + 1_{III} + 1_{I}$	29	6,3
	21_{II} — só com 2 bivalentes telosindéticos	62	13,4
	21_{II} — com mais de 2 bivalentes telosindéticos . .	179	38,7
	$19_{II} + 1_{II} + 2_{I}$	161	34,8
	Total	462	99,9 %

A título de ensaio, procurámos então determinar quais poderiam ser as várias combinações, no caso de se haver dado uma translocação recíproca viável. Para isso, desenhámos um xadrez mendeliano concebendo que os arranjos possíveis, para o caso que ora nos interessava, derivavam naturalmente do produto de seis combinações, uma com os cromosomas intactos, outra com os dois cromosomas translocados e os quatro restantes transportando

um único cromosoma translocado. Com esta tabela podemos apreciar as combinações possíveis.

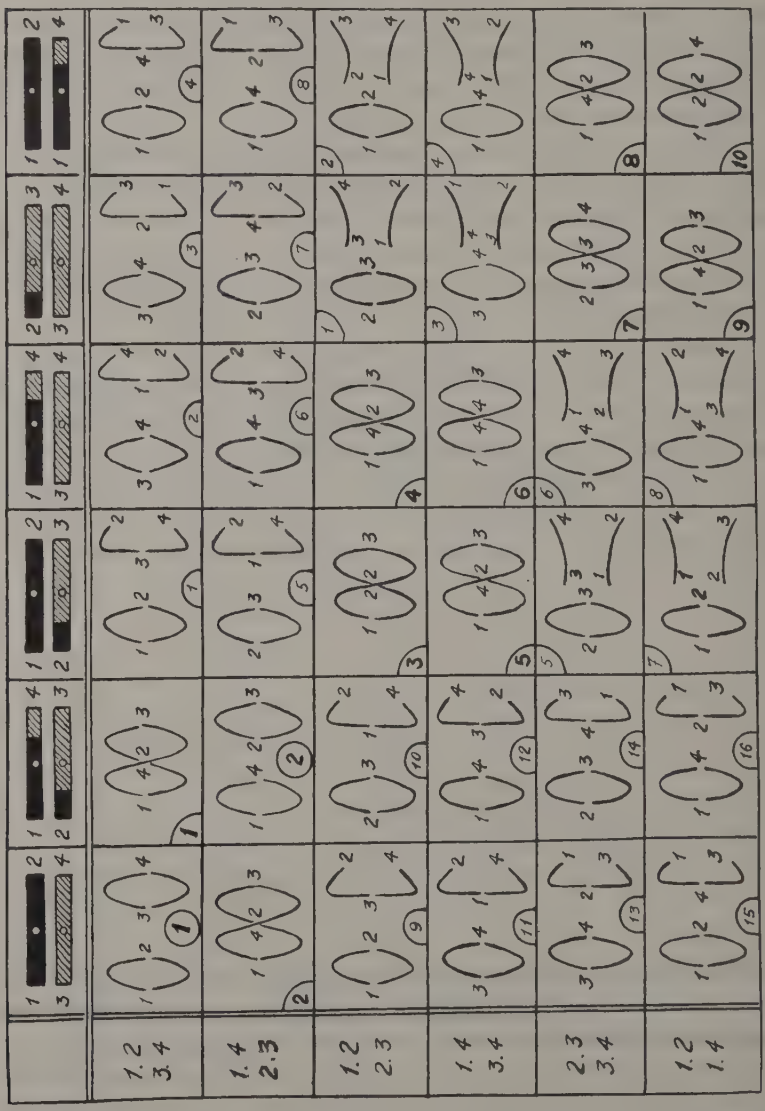


Fig. 3

Os tetravalentes apresentam-se, no material que observámos, em cadeia ou em anel de oito. Os trivalentes, sempre em cadeia.

Desta forma quiz-nos parecer que antes de mais nada se formariam os bivalentes normais e desde que estes se estabelecessem como par sindético, fechados, já não havia possibilidades de se formarem trivalentes. Estes só apareceriam, portanto, por separação acidental de um dos elementos nos tetravalentes ou mesmo por associação incompleta destes. De qualquer maneira, libertariam sempre um univalente.

Os bivalentes apresentam-se parasindéticos ou telosindéticos, como é sabido. Notámos, porém, que os telosindéticos eram bastante mais frequentes que o usual, e por isso julgámos vantajoso contar as células em que eles se apresentavam em excesso. Por último, contámos as células em que apareciam dois univalentes.

Os resultados seguintes, fornecidos pelo xadrez mendeliano, são:

$19_{II} + 1_{IV}$ ou $19_{II} + 1_{III} + 1$	10
$19_{II} + 2_{II}$ (parasindéticos)	2
idem (telosindéticos)	16
$19_{II} + 1_{II} + 2_{I}$	8

Na tabela seguinte comparam-se as indicações fornecidas por este xadres com os resultados observados, para o que se calcularam as respectivas percentagens.

TABELA I

Tipos de associações	Percentagem esperada segundo a tabela	Percentagem verificada nas 462 células observadas	Diferenças	
			Para mais	Para menos
$19_{II} + 1_{IV}$	—	6,7 %	—	—
$19_{II} + 1_{III} + 1_{I}$ . . .	—	6,3	—	—
Total de quadrivalentes e trivalentes	27,8 %	13,0	—	14,8 %
$20_{II} + 1_{II}$ (número normal de bivalentes telosindéticos)	5,5	13,4	7,9 %	—
$19_{II} + 2_{II}$ (número superior de bivalentes telosindéticos)	44,4	38,7	—	5,7
$20_{II} + 2_{I}$	22,2	34,8	12,6	—

Olhando esta tabela, reparar-se-á que àparte as frequências de bivalentes telosindéticos se verificam discrepâncias apreciáveis. Nota-se que no material observado em relação à percentagem esperada há nítido acréscimo das células com 2 univalentes. Em contrapartida a percentagem dos trivalentes e quadrivalentes, observados nas 462 células, é acentuadamente mais baixa do que a percentagem esperada.

Claro que esta comparação oferece dificuldades, pois nada nos garante que o material observado proviesse da livre combinação de gametas transportando os cromosomas translocados em todas as combinações possíveis.

Entretanto, devemos dizer que algumas destas diferenças poderiam justificar-se, em parte, pelo facto de muitas associações quadrivalentes e trivalentes não poderem manter-se na realidade. Por circunstâncias várias, desfazer-se-iam algumas dessas ligações e assim em lugar dos quadrivalentes poderiam ver-se, com mais frequência, bivalentes e cromosomas não emparelhados. Não temos, porém, nenhuma indicação positiva de que assim se passem as coisas.

Depois é necessário ter presente que nada sabemos sobre a viabilidade relativa dos vários gametas. Nada nos garante, com efeito, que todos os gametas considerados no xadrez sejam de igual potencialidade. É muito possível, com efeito, que os tubos polínicos, por exemplo, portadores de dois cromosomas normais, sejam muito mais rápidos que os outros. Daí resultaria, evidentemente uma segregação diversa da prevista, originando percentagens distintas das que se admitiram no xadrez, como ponto de partida de futuras discussões.

Finalmente, é impossível ter a certeza de que todo o material visto, das 462 células, provenha de plantas heterozigóticas, no mesmo grau, para a translocação referida.

Parece, pois, que a divergência verificada entre o observado e o esperado, através daquele xadrez mendeliano, não é de molde a arredar a hipótese, de que se partiu, de que essas associações resultavam duma translocação recíproca.

Seja como for, o que é verdade é que há forte evidência citológica de que se dão translocações em certos espeltoides do tipo γ. As associações de quadrivalentes e trivalentes, bem como os emparelhamentos entre cromosomas de dois pares diferentes, provam que existem intercâmbios segmentários. Acredita-se que

essa translocação recíproca interessa o cromosoma *C* e um outro cromosoma. Pode acontecer que este cromosoma seja algumas vezes, o cromosoma *B*, mas pode acontecer também, e, parece lógico admiti-lo, que mais frequentemente seja outro qualquer. Por isso é preferível, uma vez que não sabemos qual é, denominá-lo com outra letra, por exemplo, com *S*, só para significar que participa da formação de espeltoides.

Neste caso, a representação dos espeltoides seria:

$$19_{II} + C + Cdl.\ fSl + Sdl.\ fCl + S$$
$$19_{II} + C + Cdl.\ fSs + Sds.\ fCl + S$$

sendo *f* a peça translocada

Os esquemas da figura 4 tornam mais compreensíveis estas representações.

Terminando estas considerações sobre espeltoides do tipo γ, podemos agora registar as diversas constituições, que julgamos existirem, além das já citadas.

Como dissemos, HUSKINS dá as representações seguintes:

para os homozigóticos..... $\begin{cases} 20_{II} + Cd + Cd \\ 20_{II} + Cts + Cts \end{cases}$

para os heterozigóticos..... $\begin{cases} 20_{II} + C + Cd \\ 20_{II} + C + Cts \end{cases}$

Pelo nosso trabalho, parece que haveria conveniência em considerar mais, para os espeltoides γ, as constituições seguintes:

$$20_{II} + Cdl + Cts$$
$$20_{II} + Cds + Cts$$
$$20_{II} + Cdl + Cds$$
$$20_{II} + C + Cis$$

$$19_{II} + C + C + Bil + B$$
$$19_{II} + C + Cds + Bil + B$$

(e as combinações possíveis, com as diferentes variações dos cromosomas C)

$$19_{II} + C + Cdl + fSs + Sds.\ fCl + S$$

(e outras translocações que ocasionem roturas no cromosoma *C* nas zonas 2 ou 3 — fig. 1).

20 II + Cdl + Cts
20 II + Cds + Cts
20 II + Cdl + Cds
20 II + C + Cis
19 II + C + C + Bil + B
19 II + C + Cds + Bil + B
19 II + C + Cdl fSs + + S + Sds.fCl
19 II + 2 [Cdl.fSs] + + 2 [Sds.fCl]

Fig. 4

Concluindo, poderemos dizer que, segundo este nosso trabalho, os espeltoides do tipo γ provêm não só de deficiências no cromosoma *C*, mas também podem provir de duplicações no cromosoma *B*, e de translocações que interferem com o cromosoma *C*.

RESUMO

1. A primeira parte do estudo citológico que empreendemos, sobre os espeltoides do tipo γ, confirmou as observações anteriores de vários autores, mostrando que, para muitas plantas examinadas, são verdadeiras as conclusões revistas, recentemente por HUSKINS (1946). Nesses casos, verificou-se que os espeltoides γ são de 42 cromosomas, apresentando-se o par C com as delecções que se têm descrito.

2. Estudos ulteriores mostraram que há, em numerosas linhas de espeltoides γ, algumas características especiais a saber: (1) com mais um par de cromosomas interessado no processo de criação dos espeltoides; (2) com produção relativamente frequente de isocromosomas — que só têm sido descritos para compactoides, subcompactoides e subnormais; e por fim (3) com produção, em 13 % das células examinadas, quadrivalentes e trivalentes, percentagem bastante elevada em relação ao que se tem descrito.

3. Reconheceu-se que há espeltoides do tipo γ sem os cromosomas *C* serem alterados, emparelhando normalmente e sem denotarem qualquer delecção. Reconheceu-se mais que, nesses casos, havia sempre um isocromosoma longo. Como tal isocromosoma não pode ser nunca dos cromosomas *C*, pois se proviesse do braço mais longo — e tinha forçosamente de provir dele dado o comprimento observado — a planta, em vez de espeltoide, teria de ser compactoide, pois apresentaria dose dobrada de genes inibidores de «espeltoide». Logo, se aparece um isocromosoma longo, e não obstante isso a planta é espeltoide, há que concluir que esse isocromosoma não provém do cromosoma *C* mas sim do cromosoma *B*, o que transporta os genes para aristado e espeltoide. Parece compreensível que, uma vez que se verifique esta duplicação, mesmo que estejam presentes os cromosomas *C* inalterados, o caracter espeltoide pode revelar-se. Então deverá admitir-se que pode haver espeltoides do tipo γ com a constituição

$$19_{II} + CC + Bil.B.$$

4. As variadas provas citológicas de que se deram translocações, em numerosos espeltoides, mostram que, além dos tipos já considerados, ainda se devem admitir os seguintes, designando por *S* o cromosoma que com o *C* é envolvido na produção de espeltoides, com perda dum segmento do cromosoma *C* ou por simples «efeito de posição»:

$$19_{II} + C + Cdl.fSs + Sds.fCl + S$$

Portanto, além dum cromosoma *C* e dum *S* inalterados, teria os seus homólogos depois de sofrerem uma translocação recíproca.

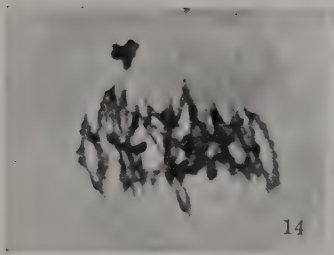
5. É possível que ainda haja condições mais complexas do que as relatadas, para os espeltoides do tipo γ, associando os vários tipos de variação descritos, englobando casos de deficiência nos cromosomas *C* com duplicações no cromosoma *B*, ou mesmo com translocações.

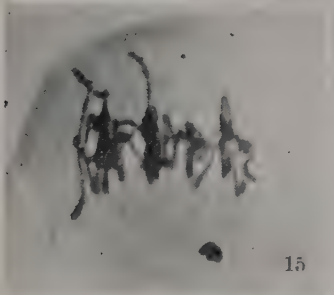
SUMMARY

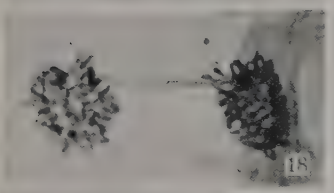
1. The first part of this cytological study on speltoids γ supports the contributions of previous authors. It was concluded that for many plants examined the conclusions reviewed recently by HUSKINS (1946) are completely right. In these cases it was observed that speltoids γ have 42 chromosomes, the *C* pair having deficiencies as has been described by several cytologists.

2. After studying several lines of speltoids which were condered as type γ, as they segregate 1 N:1 H, with very few homozigotic forms, several features of these mutants were found which seem very interesting: (1) Besides the pair of chromosomes *C* there is another pair equally envolved in the process of speltoid formation. (2) The production of isochromosomes which to this date have only been observed in compactoids, subcompactoids and subnormal plants, is clearly seen in some speltoids γ. (3) Finnally, in about 13 % of the cells studied, the production of quadrivalents and trivalents was observed.

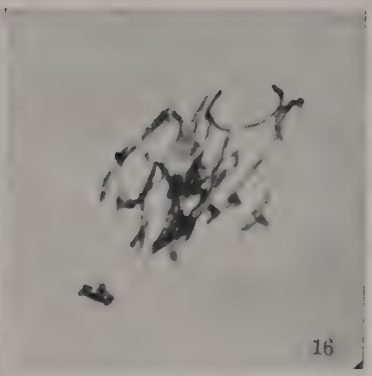
3. The presence of one long isochromosome in speltoids γ, without any apparent modification of the chromosomes *C*, was supposed to be the responsible in these cases of the character speltoid. It was thought that this isochromosome must be *Bil*, meaning that there is a duplication of the long arm of the chromosome *B*.

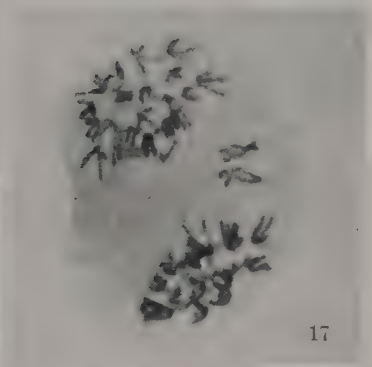

14

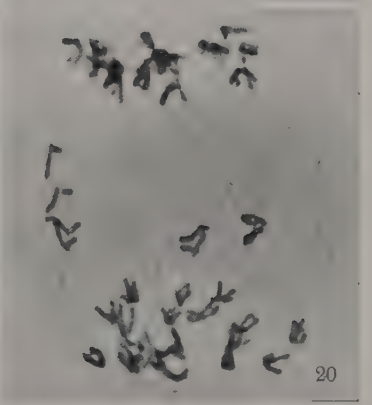

15


18

19


16


17


20

As this chromosome has the bearded and speltoid genes it is believed that in double dosis it can give the character speltoid notwithstanding the chromosomes *C*, with their inhibitors, being present.

Therefore it was assumed that there are speltoids with the constitution :

$$19_{II} + C.C + Bil.B$$

4. With the observation of frequent quadrivalents and trivalents, in a relative high percentage, 13 % of the 462 cells studied, the hypothesis that translocations may be responsible for the process of speltoid production was considered and several proofs of reciprocal translocations were analyzed. Special attention was paid to the translocations envolving chromosome *C* and another chromosome which was called *S*. It was thought that some times this chromosome *S* may be the chromosome *B*, but evidence of this is still lacking.

Anyhow it seems clear that there is a «position effect», when an important fragment of the long arm of the chromosome *C* is translocated to another chromosome, giving the complex of speltoid characters.

5. It is possible that other more complicated conditions are present in some speltoid γ associating several types here described, including deficiencies in *C* chromosomes duplications in chromosome *B* or even with translocations.

BIBLIOGRAFIA

CÂMARA, A.

1936 Notas sobre espeltoides. *Rev. agronómica*, **24** (3): 301-318.

1945 Um estudo citológico de *Triticum sphaerococcum* Perc. *Agron. lusitana* **7** (4): 291.

ELLERTON, S.

1939 The origin and geographical distribution of *Triticum sphaerococcum* Perc. and its cytogenetical behaviour in crosses with *T. vulgare*. *J. Genet*. **38** : 307-324.

HAKANSSON, A.

1930 Zytologische Beobachtungen an s. g. Speltoidheterozygoten beim Weizen. *Svensk. Bot. Tidsk.* **24** : 44-57.

1933 Zytologische Studien an compactoiden Typen von *Triticum vulgare*. *Hereditas* **17** : 155-196.

HUSKINS, C. L.

1927 Genetical and cytological studies of fatuoid oats and speltoid wheats. *Proc. V Int. Genet. Z. ind. Abst. Vereb. Suppl.* **1** : 907-916.

1928 On the cytology of speltoid wheats in relation to their origin and genetic behavior. *J. Genet.* **20**: 103-122.

1946 Fatuoid, speltoid and related mutations of Oats and Wheat. *Bot. Rev.* **12** (8) : 457-514.

NILSSON-EHLE

1920 Multiple Allelomorphe und Komplexmutationen beim Weizen. (Untersuchungen über Speltoid-mutationen beim Weizen II). *Hereditas* **1**: 277-311.

1921 Über mutmässlich partielle Heterogamie bei den Speltoidmutationen des Weizen. (Untersuchungen über Speltoidmutationen beim Weizen. III). *Hereditas* **2** : 25-76.

SEARS, E. R.

1941 Nullisomics in *Triticum vulgare. Genetics* **26** : 167-168.

1944 Cytogenetic studies with polyploid species of wheat. II Additional chromosome aberrations in *Triticum vulgare. Genetics* **29**: 232-246.

UCHIKAWA, I.

1937 Cytogenetic studies on compactoid wheat. *Jap. J. Genet.* **13** : 9-15.

UPPCOTT, M.

1937 The external mechanics of the chromosomes. VI-The behaviour of the centromere at meiosis. *Proc. Roy. Soc.* London. Series B. **124** : 336-361.

WINGE, O.

1924 Zytologische Untersuchungen über speltoids und andere mutatenähnliche Aberranten beim Weizen. *Hereditas* **5** : 241-286.

NOTA SOBRE OS *CORPOS M* DO TRICOGINIO E DO ANTERIDIO NAS *VENTURIA INAEQUALIS, V. PIRINA* E *V. ERIOBOTRYAE*

POR *BRANQUINHO D'OLIVEIRA* E
MARIA DE LOURDES D'OLIVEIRA

INTRODUÇÃO

A citologia do desenvolvimento peritecial da *Venturia inaequalis* (Cooke) Ader. foi descrita por KILLIAN (1915, 1917) e por FREY (1924), e o estudo da acção do meio ambiente sobre a formação das peritecas foi feito mais tarde por WILSON (1928). Um dos autores, na sua tese «Três espécies de *Fusicladium*» (OLIVEIRA, 1932), descreve também pormenorizadamente os primeiros estados do desenvolvimento peritecial da *Venturia inaequalis, V. pirina* e *V. Eriobotryae*, obtidos a partir de culturas conidiais *(Fusicladium)* das três espécies. Não foi então tentada a obtenção de culturas a partir de ascosporos, porque a peritecas destas *Venturias* nunca foram encontradas no centro e no sul do País, sendo só em 1938 e 1939 que se observaram peritecas das duas primeiras espécies, sobre folhas mortas de macieira e de pereira, colhidas na região montanhosa do Norte (Gouveia, Covilhã e Gerez). O desenvolvimento da *Venturia Eriobotryae* só foi observado em cultura, admitindo-se que se não dê sobre as folhas da nespereira, por nunca o termos conseguido obter, nem em Portugal (1928 a 1932 e 1935 a 1936), nem em Inglaterra (1933 e 1934). É provável, todavia, uma vez que este fungo pode infectar diversas espécies de *Pyracantha* (OLIVEIRA, 1943) além da *Eriobotrya japonica*, que seja possível obter peritecas em folhas daquelas espécies sob as condições naturais.

Em 1933 retomámos em Cambridge (Inglaterra) o estudo do desenvolvimento peritecial, partindo de culturas monospóricas de conidios das três espécies, e de ascósporos da *Venturia inaequalis* e de *V. pirina*. Verificou-se que, em todas as culturas, com excepção das de *V. inaequalis* provenientes de ascósporos de alguns raros ascos tetra-espóricos, tinha início a formação dos primórdios

periteciais isto é, das hifas de enrolamento, do pseudo-escleroto peritecial, do tricoginio e mesmo de alguns anteridios, sem que no entanto o desenvolvimento prosseguisse além desta fase. Como já fora observado em 1932: «nunca conseguimos obter formas periteciais nas culturas feitas a partir de esporo único, nem tão pouco naquelas que tinham perdido a sua fertilidade conidial» (OLIVEIRA, 1932).

Estes factos, que estavam de acordo com o que fora encontrado nos isolamentos portugueses, fizeram-nos supor primeiramente, que estávamos em presença de espécies homotálicas, em que a maturação peritecial não chegava a dar-se por efeito de condições do meio ambiente. Todavia, em certas combinações feitas posteriormente, o emparelhamento de culturas monospóricas — conidiais e ascogeniais — e de culturas mono-ascospóricas de ascos tetra-espóricos, resultou na formação do desenvolvimento peritecial, observando-se, em culturas de cerca de 4 meses, peritecas já com ascos. Esta observação levou-nos a considerar a *Venturia inaequalis*, a *V. pirina* e a *V. Eriobotryae* como espécies normalmente heterotálicas e a apresentarmos, na primavera de 1934, na exposição anual da Cambridge Natural History Society, uma série de culturas de origem bi-espórica, em célula de Van Thiegham sob a designação de «Sexual phenomena on *Venturia*», onde se mostrava a conjugação do tricoginio com o anteridio nas suas diversas fases, chamando-se especialmento a atenção para o rápido movimento de certos corpos intra-tricoginiais e intra-anteridiais, que nesta nota descreveremos como *corpos móveis* (corpos *M*) do tricoginio e da anteridio.

KEITT e PALMITER, em 1937, mostraram que os oito ascósporos de cada asco de *Venturia inaequalis* se podem dividir em dois grupos de quatro esporos, hermafroditas, auto-estéreis, estéreis intra-grupo e férteis inter-grupo. Numa série de magníficos trabalhos, KEITT e os seus colaboradores (1938, 1940, 1941 e 1943), descrevem também o heterotalismo na *Venturia pirina* (LANGFORD & KEITT, 1940); a importância deste fenómeno na produção de novas raças fisiológicas e morfológicas de *Venturia inaequalis* pela hibridação e segregação das raças estudas é posta em evidência por KEITT et alt. em 1938, 1941 e 1943. Em nenhum destes trabalhos, porém, se encontra qualquer referência aos corpos *M* do tricoginio e do anteridio que passaremos a descrever.

MATERIAL E MÉTODOS

Todas as culturas estudadas eram de origem monospórica, (conidios e ascósporos), isoladas inicialmente para agar Dox, e depois emparelhadas segundo todas as combinações possíveis, sobre um meio contendo partes iguais de líquido Dox (com 1,5 % de maltose, OLIVEIRA, 1932) e de extracto de folhas de macieira, pereira ou nespereira (20 grs. de folhas secas por litro de água destilada, autoclavadas durante vinte minutos a uma atmosfera) conforme a espécie considerada, e solidificada com 1,5 ou 2 % de agar. Os emparelhamentos foram feitos tanto em placas de Petri como em tubos de cultura, que depois de 15 dias de desenvolvimento sob as condições de laboratório eram transferidas para a geleira e conservadas a uma temperatura de 5-7° C., depois sujeitas a períodos alternados de 15-30 dias de baixa temperatura e de temperatura do laboratório. Todos os emparelhamentos que se mostraram férteis foram repetidos, fazendo-se a sua cultura em célula de Van Thiegham, sobre uma fina película de gelose da composição atrás indicada; o inóculo de cada um dos haplontes era colocado em lado oposto da lamela, para tornar mais fácil a observação da linha de contacto dos dois micélios. As culturas assim preparadas eram conservadas umas sob as condições do laboratório, outras sujeitas a períodos alternados de temperatura baixa e de temperatura ambiente. Sob estas condições não foi possível obter completo desenvolvimento peritecial, mas observou-se perfeitamente a conjugação do anteridio com o tricoginio, o que permitiu desenhar, em dias sucessivos, as diversas fases da fertilização. Sempre que se pretendia estudar qualquer pormenor citológico, as culturas eram fixadas em Flemming medio, Navashin ou formalina-cromo-acético, depois coradas com hematoxilina e contrastadas com verde luz ou Orange-G, ou então coradas com triplice-Flemming. Para o estudo «in vivo» dos *corpos M* procedeu-se á coloração vital com azul de metilene, á tríplice coloração com vermelho neutro, azul de metilene e castanho de Bismark, ou recorreu-se á coloração pelo verde de Bentz. Porém, só se obtiveram bons resultados com o primeiro destes métodos. A observação das colorações vitais foi feita usando uma objectiva de imersão em água.

OBSERVAÇÕES

O início do desenvolvimento peritecial é independente da origem monospórica ou polispórica da cultura. Num e noutro caso, ainda que muito mais raramente no primeiro, se observou o aparecimento de hifas de enrolamento elicoidal (Est. I e Est. III), a formação de um pseudo-escleroto pelo desenvolvimento das hifas elicoidais e das hifas envolventes, e o desenvolvimento do tricoginio. A formação do tricoginio verificou-se algumas vezes ter lugar directamente sobre a célula terminal de uma hifa, sem o aparecimento das hifas de enrolamento (Est. III, fig. 20), e outras vezes observou-se o aparecimento de dois tricoginios no mesmo primordio peritecial (Est. III, fig. 25). O tricoginio, mesmo nas culturas monospóricas, é ocasionalmente procurado pelos anteridios, que por vezes apresentam dimensões gigantes (Est. III, fig. 28), e estabelecem com ele contacto; todavia, nas culturas nestas condições, não se observa a plasmogamia destes dois órgãos, nem os primórdios periteciais se vêm a diferenciar em peritecas. Na maior parte das culturas monospóricas o que sucede é o tricoginio não ser contactado por nenhum anteridio e passado certo tempo o seu protoplasma torna-se largamente vacuoloso, septa-se por vezes (Est. III, fig. 21 a 24 e Est. V, fig. 2 a 4) e acaba por engelhar e degenerar (Est. V, fig. 5). Nalguns casos o tricoginio emite um tubo micelial que procura uma hifa a que se enrola, noutros, ao que parece sob o estímulo do tricogínio, forma-se um pseudo-anteridio numa hifa micelial visinha. Em material fixado e corado com hematoxilina observou-se que, tanto o tricoginio como o anteridio eram pluri-nucleados, mas mais frequentemente bi-nucleados (Est. III, 30, 31, *Venturia pirina*).

No material vivo pudemos notar que os fenómenos sexuais são sempre precedidos de activos movimentos do conteúdo celular no tricoginio. Estes movimentos podem ser sumàriamente descritos da seguinte forma:

I) — Depois de uma hifa se ter enrolado sobre si própria umas poucas de vezes, até formar um pequeno corpo esclerocioide, surge do interior desta massa uma célula alongada, de paredes delicadas e citoplasma hialino aparentemente sem movimento: é o tricoginio.

II) — Á medida que o tricoginio se desenvolve, o conteúdo celular torna-se denso e com pequenas granulações.

III) — Cerca de uma semana mais tarde, á temperatura do laboratório, começam a notar-se no citoplasma do tricoginio os primeiros sinais de vibração. Pouco tempo depois é possível distinguir um ou dois, ás vezes mais, pequenos corpos hialinos que se mostram dotados de movimento, a príncipio lento, talvez de natureza browniana. Mais tarde, este movimento torna-se mais e mais rápido, percorrendo cada um destes corpúsculos, a que chamaremos corpos *M*, o tricoginio em todas as direcções, com um movimento aparentemente activo. No caso de tricoginios bi-celulares estes fenómenos verificam-se em geral apenas na célula terminal, mas também se observou na célula basal ou em ambas.

IV) — Nesta fase duas circunstâncias se podem verificar: a) a aproximação de anteridios; b) a ausência de contacto de qualquer anteridio com o tricoginio.

a) No anteridio, depois do seu contacto com o tricoginio ou um pouco antes, pode notar-se que 4, 5, 6 ou mais (?) corpúsculos semelhantes ao do tricoginio entram por sua vez em movimento vibratório. Muitas vezes, á medida que estes movimentos se intensificam nos anteridios, observam-se, no topo do tricoginio, corpúsculos paralizados, de conformação idêntica á dos *corpos móveis*. Depois da ruptura ou plasmolise da membrana do tricoginio pelo anteridio, ou da deste por aquele, torna-se visível o contacto ente os dois protoplasmas, tendo sido possível observar a passagem de corpúsculos em movimento de um para o outro: este estado de activa comunicação pode durar ainda um ou dois dias, após o que o citoplasma se torna mais denso, paralisando a pouco e pouco o movimento dos *corpos M*. O tricoginio é envolvido então por novos anteridios, ou por hifas do tipo vegetativo, prosseguindo o desenvolvimento peritecial.

b) Se o tricoginio não entra em contacto com um anteri-

dio deforma-se, emitindo algumas vezes, como já dissemos, um prolongamento para um hifa, chegando mesmo a anastomosar-se com ela. O movimento intra-celular diminui de intensidade, torna-se cada vez mais lento, até paralisar de todo. Então o citoplasma torna-se primeiro alveolado, depois com grandes vacúolos e o tricoginio acaba por enrugar.

De todos os métodos de coloração vital experimentados o único que permitiu uma perfeita observação do movimento dos *corpos M* foi o do azul de metilene (solução a 1/100.000 em água distilada neutra. Poucos minutos (20 a 30) após a deposição de uma gota da solução de azul de metilene sobre a culturas os *corpos M* tomavam uma coloração azulada refrangente, tornando-se mais distintos, sem que os seus movimentos fossem aparentemente prejudicados. Foi assim mais fácil de observar a passagem destes corpos do anteridio para o tricoginio, e o seu movimento dentro de um e de outro destes órgãos, verificando-se também que as suas dimensões são bastante menores do que as do núcleo do tricoginio. O vermelho neutro e o castanho de Bismark, quer em solução simples quer em solução tríplice, não coraram os *corpos M* e prejudicaram o seu movimento. A coloração com o verde de Bentz foi de igual modo tóxica para o fungo, não permitindo, além disso, melhor observação do que a obtida com o azul de metilene.

Em material fixado e corado pela hematoxilina e pelo tríplice Flemming não foi possível identificar com precisão quaisquer inclusões que representassem os *corpos M* do material vivo. É de admitir, porém, que estas formações possam vir a ser reveladas no material com auxìlio de outros corantes.

DISCUSSÃO

Embora não seja possível definir a função dos *corpos M*, a coincidência da sua actividade com o período de actividade do tricoginio e do anteridio, fazem prever que eles tenham uma acção determinante no processo sexual, muito possìvelmente como factores dinâmicos da translocação citoplasmática. Será do maior interesse verificar se corpos de igual natureza se encontram nos tricoginios e nos anteridios de outras espécies e se este fenómeno é de caracter geral.

SUMMARY

NOTE ON THE «*M BODIES*» OF THE ANTHERIDIUM AND TRICHOGYNE OF *VENTURIA INAEQUALIS, V. PIRINA* AND *V. ERIOBOTRYAE*

The present Note reports a cytological study of certain phenomena observed to occur during fertilisatian in three species of *Venturia*.

After describing some experiments undertaken to demonstrate heterothalism in these species, which were carried out during the years 1928-32 in Portugal and 1933-34 in England (Cambridge), the authors present the results of some observations made on cultures of *Venturia inaequalis*, *V. pirina* and *V. Eriobotryae*, showing the activities of some bodies observed on the antheridial and trycogyneal cells before and during fertilisation.

The cytology of the primordial stages of perithecial formation in *Venturia* is described, begining with the appearance of the trichogyne and the antheridium to the end of the conjugation process and the disappearance of these organs. At first, the contents of both the trichogyneal and the antheridial cells is hyalin and does not show much activity; but, as these organs approach maturity, the protoplasm becomes more consistent and granular. On the trichogyne it is possible to distinguish, some time later, a vibratory motion of the protoplasm, and at first one or two, later more, small bodies may be seen, which show activ motility. These corpuscules, which we shall name «*M bodies*» (motile bodies), soon become animated of very rapid motion, and can be seen running all over the cell. On a bi-celular trichogyne «*M bodies*» are usually present only on the apical cell, but they may also be observed on the basal one or on both. On the antheridium, from 4 to 6 or more of these corpuscules, can be seen after its contact with the trichogyne or short before that. After plasmolysis of the cell wall has taken place, and the protoplasms of the antheridium and the trichogyne come into contact, several of these motile bodies can be seen passing from one to another of the two cells. One or two days later, the protoplasm becomes thiker and all movement ceases. If a trichogyne does not come in contact with an antheridium the intracellular movement becomes slow and after a few days ceasses altogether.

Methylen blue in bi-distilled water (1/100.000) was used with much success as a vital stain which allowed the observation of these phenomena on living cultures kept for three or four months on Van Thiegham cells.

The possible significance of these bodies is discussed and it is suggested that investigations should be made on other species to find out if similar phenomena can be observed.

BIBLIOGRAFIA

FREY, C.

1924 The Cytology and Physiology of *Venturia inaequalis* (Cook) Winter. *Trans. Wisc. Acad. Sc.* **21**, 303-343.

KEITT, G. W.

1941 A preliminary Report on genetic studies on pathogenicity and the nature of saltation in *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **31**, 1142.

KEITT, G. W. & PALMITER, D. H.

1937 Heterothalism in *Venturia inaequalis*. *Science*, n. s. **85**, 498.

1938 Heterothalism and variability in *Venturia inaequalis*. *Amer. J. Bot.* **25**, 338-345.

1941 *Venturia inaequalis* (Cke) Wint. I. — A groundwork for genetic studies. *Amer. J. Bot.* **28**, 805-820.

KEITT, G. W. & LANGFORD, M. H.

1940 A preliminary Report on variability and inheritance in *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **30**, 452-453.

KEITT, G. W. & LANGFORD, M. H. & SHAY, J. R.

1943 The inheritance of pathogenicity and certain mutant characters in *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **33**, 19.

KILLIAN, K.

1915 Ueber die Entwicklung der Perithecien bei *Venturia inaequalis* (Cooke) Ad. *Ber. Deuts. Bot. Ges.* **33**, 164-168.

1917 Ueber die Sexualität von *Venturia inaequalis* (Cooke) Ad. *Zeit. Bot.* **9**, 353-416.

LANGFORD, M. H. & KEITT, G. W.

1940 Heterothalism in *Venturia pirina*. *Phytopathology* **30**, 452.

OLIVEIRA, B. D'

1932 *Três espécies de Fusicladium*. Tese dactilografada, com 461 páginas e 46 estampas, vários gráficos e um mapa. (Biblioteca do Instituto Sup. de Agronomia, Lisboa).

1943 Sobre a unidade específica dos *Fusicladium Eriobotryae* (Alm.) Cav. e *F. Pyracanthae* (Otth.) Rostrud. Tese apresentada ao I Congresso Nacional de Ciências Agrárias, Lisboa.

WILSON, E. E.

1927 Studies on the ascigerous stage of *Venturia inaequalis* (Cke) Wint. in relation to certain factors of the environment. *Phytopathology* **18**, 375-418.

LEGENDAS DAS GRAVURAS

ESTAMPA I (Oliveira, 1932, Est. XXXIX)

1) — Cultura de origem poli-conidial de *Venturia inaequalis* com abundantes desenvolvimentos periteciais.
2) — Cultura de *Venturia pirina* de origem conidial com primordios periteciais.
3) — *Venturia inaequalis*. Em baixo: hifa micelial com o início de um desenvolvimento papilado, pródromo de hifa de enrolamento (800 ×).
4) — Idem. Primeira célula de hifa de enrolamento (800 ×).
5-7) — Idem. Primeiras ansas da espiral de enrolamento (600 ×).
8) — Conjugação do tricoginio com o anteridio. Notar a formação do tricoginio a partir de uma célula do micelio — ausência de ascogonio diferenciado — e o enrolamento de malhas grossas a partir de ramificações de diferentes células das duas hifas (230 ×).
8a) — Idem. Aspecto do mesmo primórdio peritecial três dias depois (cultura conservada a 15° C.). Notar a presença de diferentes hifas anteridiais, de micelio irregular e anguloso, que estão envolvendo o tricoginio e parte da periteca (200 ×).
9) — Idem. Tricoginio formado sobre uma célula gigante do micelio (230 ×).
9a) — Idem. A mesma formação três dias depois: tricoginio e anteridio colados e já quase imersos na parede do primórdio peritecial constituído pelo entrelaçado de hifas nascidas de uma célula gigante (230 ×).

ESTAMPA II (Oliveira, 1932, Est. XL).

1) — Cultura policonidial de *Venturia Eriobotryae*, mostrando à esquerda uma frutificação conidial e á direita um primórdio peritecial em que o tricoginio é contactado por diversos anteridios (100 ×).
2) — *Venturia Eriobotryae*. Primeira fase de um enrolamento em espiral (700 ×).
3-5) — Primórdios periteciais. 3): Quatro anteridios contactantes com

um tricoginio. 4): Um anteridio sobre um tricoginio. 5): Dois anteridios visíveis sobre o tricoginio (700 ×).

6) — *Venturia virina*. Primórdio peritecial: tricoginio septado.

ESTAMPA III (Oliveira, 1932, Est. XLI).

1 a) — *Venturia inaequalis*. Hifa micelial com diferentes enrolamentos simples em início.

1-5) — Idem. Fases sucessivas dos primórdios do enrolamento peritecial, desde o aparecimento do mamilo até à formação da primeira espira.

6) — Idem. Hifa ondulando antes de começar o enrolamento.

7) — *Venturia pirina*. Início do enrolamento.

8-9 a) — *Venturia Eriobotryae*. Primórdios de enrolamento sobre a célula mãe.

6 b) — *Venturia pirina*. Tricoginio desenvolvendo-se directamente sobre a célula mãe da hifa de enrolamento.

11) — Idem. Hifa de enrolamento já com três espiras.

12) — Idem. Início de enrolamento múltiplo a partir das ramificações duma célula gigante.

14-15) — Idem. Início de um enrolamento duplo.

16-18) — *Venturia inaequalis*. Diversas fases de um enrolamento múltiplo.

20) — *Venturia Eriobotryae*. Tricoginio formado directamente sobre a célula terminal de uma hifa, entrando em contacto com dois anteridios.

21-24) — *Venturia pirina*. Primórdios periteciais com o tricoginio visivelmente septado.

25) — Idem. Primordio peritecial com dois tricoginios.

26) — *Venturia Eriobotryae*. Tricoginio contactado por três anteridios desenvolvidos da mesma hifa do micelio anguloso (micelio anteridial?).

28) — Idem. Anteridios gigantes do tipo *oidalae* em culturas monosporicas.

29) — *Venturia inaequalis*. Primórdios periteciais, mostrando à esquerda um tricoginio contactado por cinco anteridios.

30) — *Venturia pirina*. Primórdio peritecial com tricoginio bi-nucleado, contactado por três anteridios, um dos quais mais ou menos digitado (tipo Killian, pouco vulgar).

31) — Idem. Tricoginio e anteridio, ambos bi-nucleados.
32) — Idem. Cultura mono-espórica: tricoginio envolvido por anteridios quase indiferenciados.
33) — Idem. Início de formação estromática, sem desenvolvimento tricoginial.

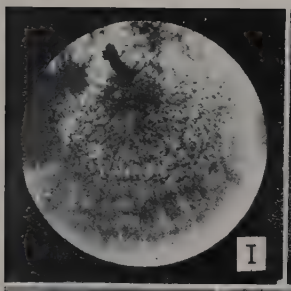
ESTAMPA IV

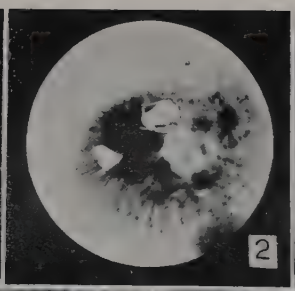
Venturia inaequalis (cerca de 900×): Estados sucessivos do desenvolvimento de um primórdio peritecial numa cultura fértil, de origem bi-ascóspora, em célula de Van Thiegham.
1) — (25/9/1933). Tricoginio de protoplasma densamente granuloso com dois *corpos M* que mostram apenas leves vibrações.
2) — (18/9/1933). Tricoginio contactado por quatro anteridios, mostrando diversos corpusculos, dos quais apenas os dois maiores se moviam ràpidamente. Anteridios com diversos *corpos M.*
3) — (22 9/1933). Após a plasmogamia dos anteridios com o tricoginio, diversos *corpos M* penetram no tricoginio, onde se conservam em movimento muito lento.

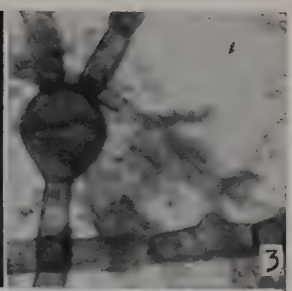
ESTAMPA V

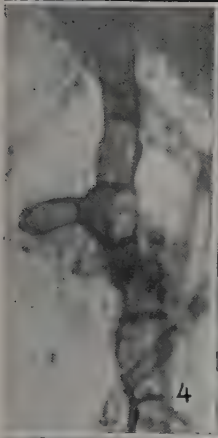
Venturia inaequalis

1) — Corte de uma cultura bi-ascospórica fértil, fixada com Flemming médio e corada com hematoxilina férrica, mostrando a conjugação do anteridio com o tricoginio, vendo-se um dos núcleos do anteridio dentro do tricoginio (cerca de 2.000×).
2-3) — Fases sucessivas de um primordio peritecial de uma cultura de origem mono-ascosporica, desenhadas respectivamente a 13 e a 18 de Outubro de 1933, verificando-se que o tricoginio se septou progressivamente. A 13 só se observavam *corpos M* na célula terminal, ao passo que em 18 apenas na célula basal se observou um corpusculo móvel (700×).
4) — Primórdio peritecial de cultura mono-espórica, com tricoginio tri-septado e outro com um pseudo-anteridio desenvolvido a partir de uma hifa vizinha. Neste período nenhum dos *corpos M* se encontrava em movimento (700×).
5) — Tricogínio degenerado numa cultura mono-espórica.

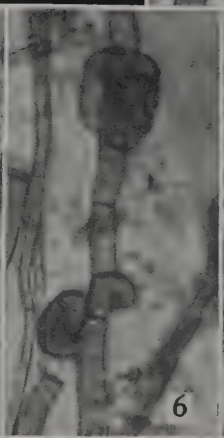

I

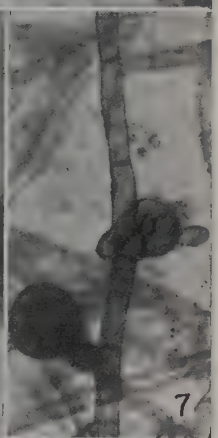

2

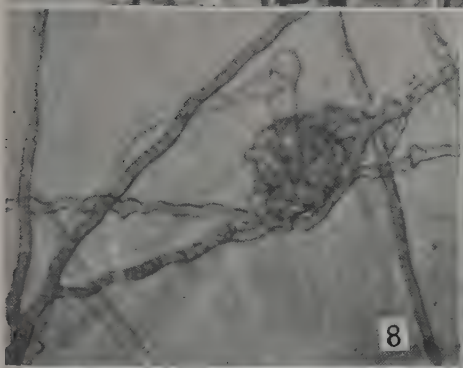

3

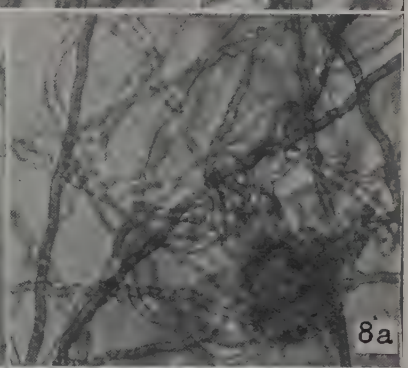

4

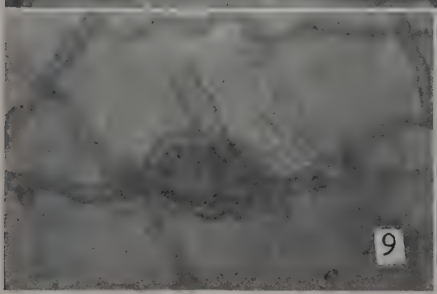
5

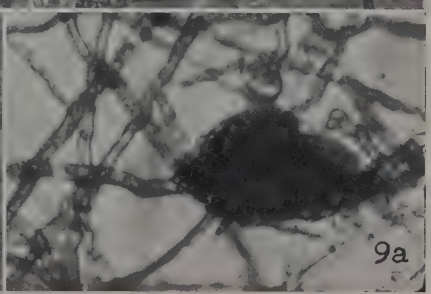

6

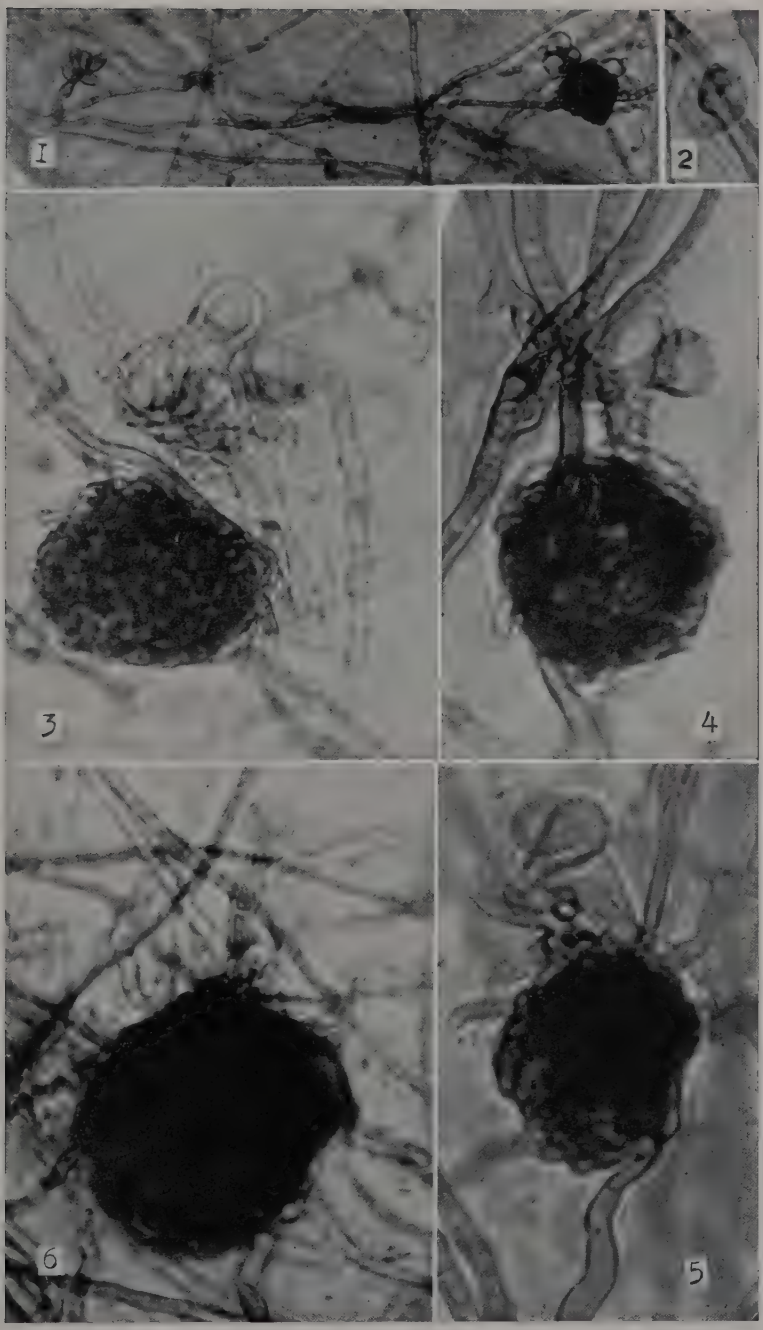

7

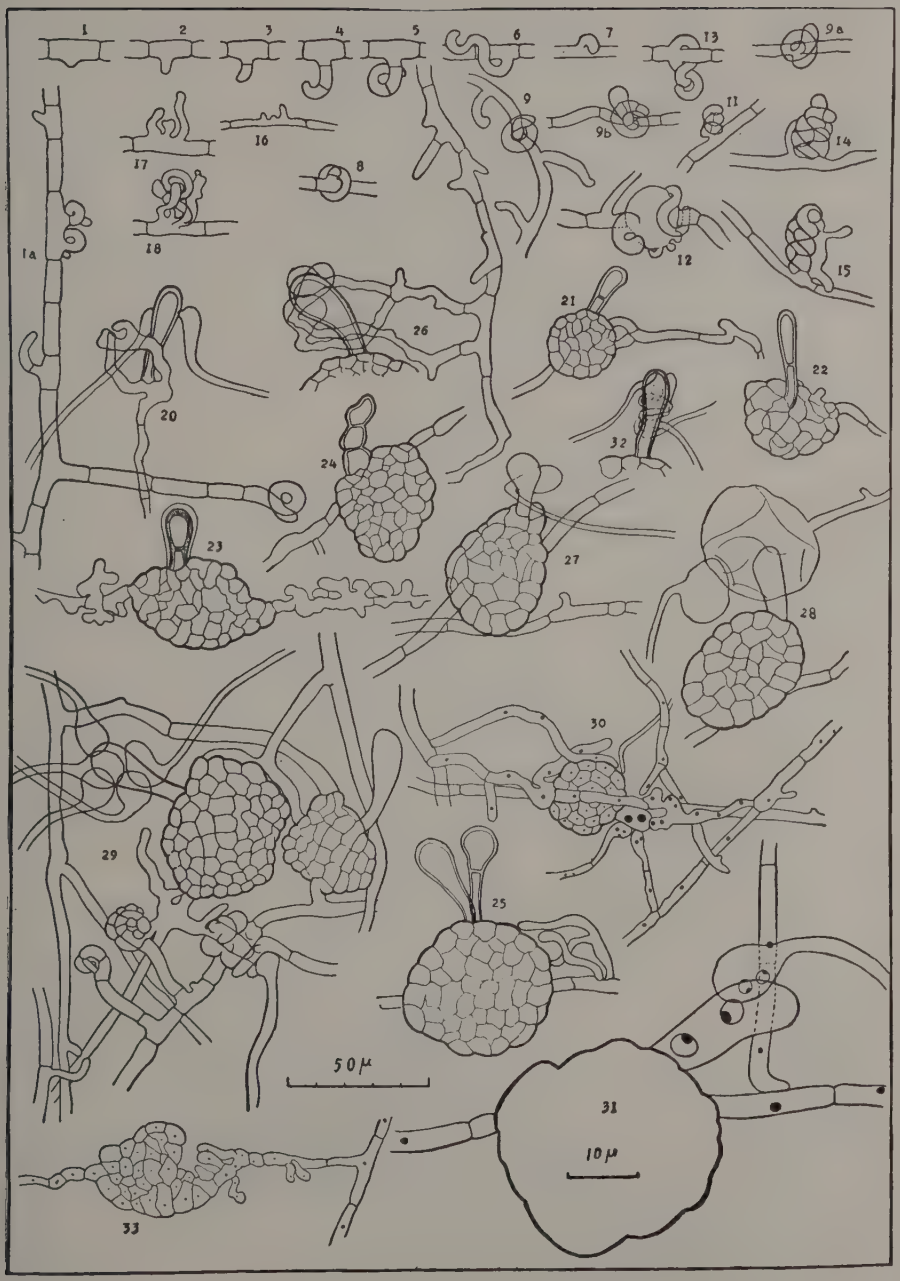

8

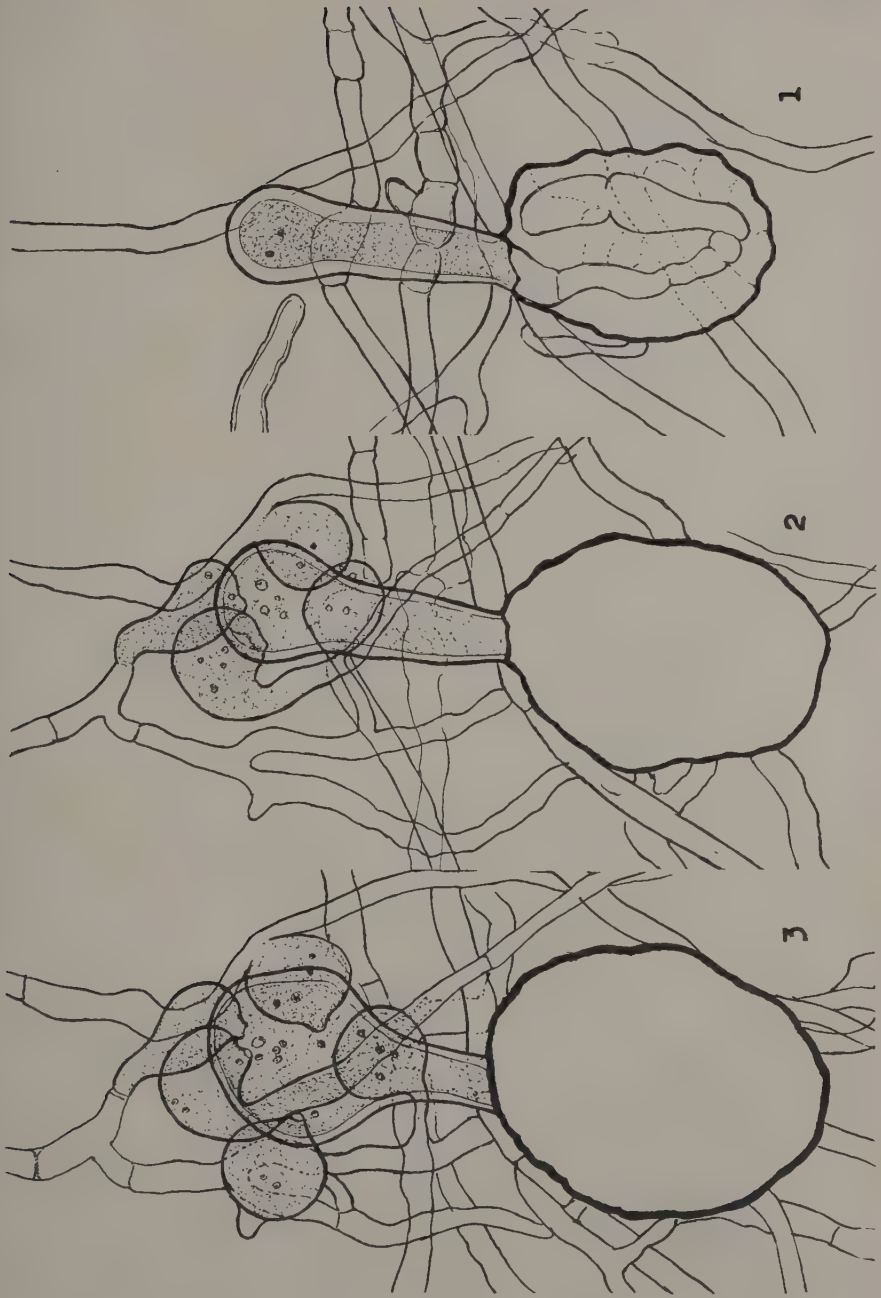

8a


9

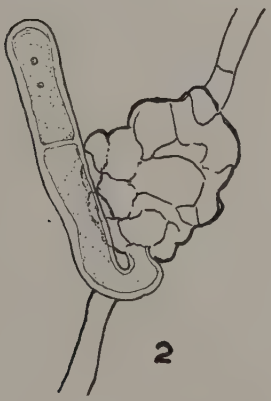

9a


1
2
3
4
6
5

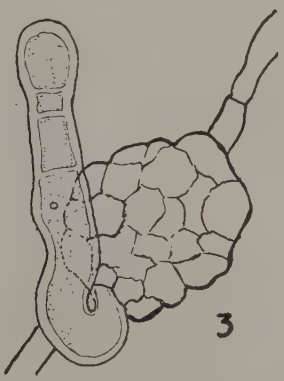

1
2
3
4
5
6
7
13
9a
9
9b
11
14
17
16
8
18
1a
12
15
21
26
22
20
32
24
23
27
28
30
29
25
50μ
31
10μ
33


1
2
3

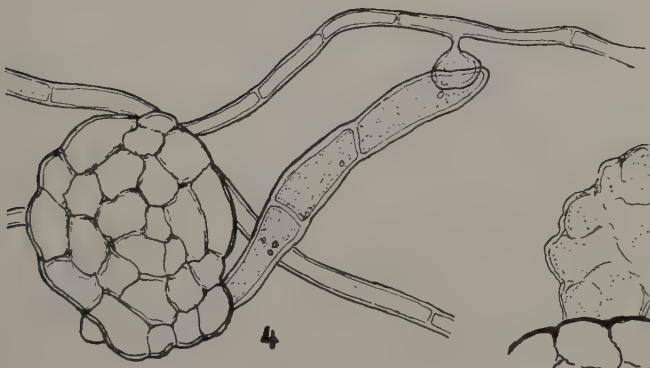
1



2



3



4

5

NOTAS ACERCA DO APARECIMENTO DA «DOENÇA DA TINTA» DO CASTANHEIRO NOS VIVEIROS DOS SERVIÇOS FLORESTAIS PORTUGUESES

POR *ANTÓNIO AUGUSTO LOPES PIMENTEL*
(Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas e Estação Agronómica Nacional)

QUANDO, em Janeiro de 1941, iniciámos o estudo da «doença da tinta» do castanheiro, os Serviços Florestais Portugueses já no ano anterior tinham assinalado uma elevada mortalidade nos castanheiros de alguns dos seus viveiros, sem que se conhecesse a sua verdadeira causa. Dado o interesse que o assunto representava para nós e a gravidade de tal facto, pois desde logo se suspeitou de que se tratava da referida doença, resolvemos fazer as nossas primeiras observações nesses viveiros.

Em Junho daquele mesmo ano e acompanhados pelo Chefe da 1.ª Circunscrição Florestal, o Sr. Engenheiro Silvicultor AUGUSTO FERREIRA MACHADO, percorremos, por isso, alguns dos viveiros daquela Circunscrição, designadamente os de «Portodeira» (Serra de Arga), «Serradela» (Serra da Cabreira), «Paradança» e «Sobreira» (Perímetro de Mondim de Basto) e o de Amarante, tendo verificado que, na verdade, existia uma doença largamente espalhada em vários talhões de castanheiros (*Castanea sativa* Mill.) e de nogueiras (*Juglans regia* L.). Mais tarde, em Setembro, voltámos a encontrar a mesma doença noutros viveiros, também no Norte, como o de «Vidoeiro» (Serra do Gerês), «Pedra Maria» e «Turio» (Serra da Cabreira).

Do material que então aí colhemos foi-nos possível isolar dois fungos parasitas, de cujo estudo nos ocupámos subsequentemente, tendo chegado à conclusão de que se tratava, segundo a bibliografia existente, de duas estirpes de *Phytophthora cambivora* (Petri) Buis., mas diferindo bastante na sua morfologia, biologia

Recebido para publicação em Maio de 1946.

e grau de patogenicidade (2). Um destes fungos, o mais virulento e frequente, foi também isolado. nessa mesma ocasião, de plantas de *Pseudotsuga Douglasii* Carr. e de *Quercus Robur* L. Posteriormente, conseguimos isolá-lo da *Q. Suber* L. e da *Betula alba* L. (1).

O ataque da doença no viveiro de «Portodeira» e no de Amarante foi rápido, pois, tendo-se observado o seu aparecimento nos princípios de Maio, em Setembro do mesmo ano não restavam senão alguns exemplares sãos, que acabaram, igualmente, por ser atingidos. Verificou-se, por este modo, uma perda total avaliada em 35.000 castanheiros que conjuntamente com as previstas para os restantes viveiros, em que a acção do parasita foi mais lenta, devia ter atingido a soma de 120.000. Por informações que na mesma ocasião colhemos, soubemos que nos castanheiros de alguns viveiros da 2.ª Circunscrição Florestal se tinham observado, também, grandes perdas.

Parecendo-nos estranha uma tão súbita invasão dos viveiros

---

(1) O estudo destes fungos foi apresentado em quatro comunicações que intitulámos:

1942 Primeiras notas para o estudo de uma doença do castanheiro e nogueira, observada nos viveiros florestais e causada por um Ficomiceta.

1943 Estudo comparativo de dois fungos do género *Phytophthora* de Bary, parasitas do castanheiro.

1944 O sobreiro também é parasitado pela *Phytophthora cambivora* (Petri) Buiss., agente da «doença da tinta» do castanheiro.

1945 Novas observações sobre a morfologia, biologia e fisiologia de dois fungos do género *Phytophthora* de Bary, parasitas do castanheiro.

(2) Como consequência das modernas investigações de URQUIJO (Espanha) sobre a «doença da tinta» do castanheiro, cujos resultados os nossos estudo, de certo modo, confirmam e, em parte, ampliam, pretende-se actualmente fazer o desdobramento da espécie *P. cambivora*, criando-se uma nova espécie de *Phytophthora*, pois que as diferenças, de carácter morfológico, biológico e fisiológico, encontradas entre os organismos que serviram de base àqueles estudos, são comparáveis às que se verificam entre outras espécies do mesmo género. O fungo por nós isolado de diferentes essências florestais poderá, assim, ser incluído nessa nova espécie micológica, sendo o outro parasita, apenas isolado do castanheiro, a verdadeira *P. cambivora*. Os resultados das nossas observações indicam, no entanto, não ser de excluir a possibilidade da reintegração, como espécie bem definida, da *P. cinnamomi* Rands, que presentemente se considera como uma estirpe de *P. cambivora* e com a qual o primeiro daqueles parasitas apresenta uma certa afinidade de caracteres.

pela *P. cambivora*, (1) desde logo procurámos estudar a causa e uma suspeita se formou imediatamente no nosso espírito — a de que a doenca não apareceu naturalmente nos viveiros mas sim que foi lá introduzida —, em face dos elementos gerais obtidos e que a seguir expomos:

1) A doença manifestou-se simultâneamente na quase totalidade dos viveiros da 1.ª Circunscrição Florestal que em 1940 foram semeados de castanha de uma mesma origem, pois que apenas se exceptua um deles, o viveiro de «Tinhela» (Serra da Padrela). O mesmo se verificou noutros que o foram no ano imediato;

2) — A castanha para semente era proveniente da região de Vila Pouca de Aguiar, onde, segundo informações e observações pessoais, a «doença da tinta» parece existir há já anos e ter causado devastações consideráveis;

3) — O viveiro de «Portodeira», aquele em que o ataque do fungo foi mais intenso, tinha sido cultivado pela primeira vez em 1941 e está situado numa vasta região em que o castanheiro não existe;

4) — Pelo menos para os viveiros da Serra da Cabreira não notámos a presença, nas suas proximidades, de castanheiros adultos, isolados ou em povoamentos, com sintomas evidentes de doença.

Tomando em consideração os conhecimentos adquiridos, pela bibliografia que pudemos consultar, sobre a biologia da *P. cambivora*, as condições de isolamento em que parece encontrar-se grande parte dos viveiros e a simultaneidade da sua infecção inesperada, não achámos explicação fácil para a sua invasão pela doença. Uma vez que o viveiro de «Portodeira» está situado numa região em que o castanheiro não existe, como explicar o aparecimento da doença se regeitarmos, por nos parecerem de muito difícil realização, os processos conhecidos de propagação natural do fungo a distância? Realizar-se-ia por intermédio de outras espécies vegetais consideradas como susceptíveis, incluindo hospedeiros herbáceos, que TUCKER menciona, e que possam existir nas proximidades do referido viveiro? Sabe-se hoje que a urze

(1) Como, por enquanto, não está ou constituída a nova espécie de *Phytophthora* de que atrás falámos ou, possìvelmente, reintegrada a *P. cinnamomi*, consideramos, ainda, nesta exposição, um só agente patogénico, a *P. cambivora*.

(*Erica* spp.) é um dos hospedeiros da *P. cambivora* e supõe-se actualmente que o simples avanço do micélio do fungo através da matéria orgânica superficial do solo lhe permite transpôr grandes distâncias, ainda que muito lentamente. Contudo, parecendo-nos deveras significativa a simultaneidade do aparecimento imediato da doença na grande maioria dos viveiros que em 1940 e 1941 foram semeados com castanha proveniente de uma região invadida pelo fungo, fomos levados a supor que seria muito aceitável a ideia de que este tivesse sido transportado com a própria castanha usada para semente. Assim, no nosso primeiro trabalho sobre a doença (1942), em cuja parte final tentámos dar uma explicação do facto, expuzemos que não podendo o micélio penetrar no tegumento da castanha, como afirma PETRI, ou ser transportado à sua superfície, o único processo de propagação a admitir seria aquele que se realiza por intermédio dos esporos sexuais, visto que a vitalidade dos zoósporos é limitadíssima. Ora, existindo aqueles, como se julga, à superfície do terreno dos soutos em que o fungo vive como saprófita, (1) dadas as suas condições naturais de resistência à acção dos agentes externos e efectuando-se a queda da castanha numa época que geralmente coincide com a das primeiras águas de Outono, pareceu-nos muito provável que, na poeira deste modo fàcilmente aderente ao tegumento daquela, fossem juntamente alguns esporos. Poderiam, assim, ser transportados a grandes distâncias e propagar a doença com extraordinária facilidade, pela sua germinação, quando a castanha é lançada à terra.

Como se deve supor, não sabiamos até que ponto a referida hipótese podia ser tomada em consideração, dada a grande dificuldade em a demonstrar. Presentemente, porém, depois de em tempos termos feito novas observações e pensado bastante no

(1) Devemos esclarecer aqui que a biologia do parasita que isolámos de diferentes essências florestais, o qual virá ou a formar uma nova espécie de *Phytophthora* ou a ser identificado com a *P. cinnamomi*, não é inteiramente conhecida e, por consequência, não podemos assentar ideias quanto à existência dos seus esporos sexuais à superfície do terremo dos soutos infectados, como acontece, segundo PETRI, com a verdadeira *P. cambivora*. No entanto, embora se desconheça, ainda, o verdadeiro significado biológico dos clamidósporos, característicos daquele Ficomiceta, supõe-se que eles possam desempenhar, em substituição dos oósporos, papel importante na propagação da doença a grandes distâncias.

assunto, cremos, pelo que adiante expomos, que seja mais razoável uma outra explicação que então nos ocorreu, embora equivalente à primitiva ideia:

1) — O viveiro de «Tinhela», na Serra da Padrela (Vila Pouca de Aguiar), aquele que, por todos os motivos, já devia estar infectado, ainda não o estava em 1944. Quando em 1941 o encontrámos isento da doença, estando os outros já contaminados, atribuímos isso a, provàvelmente, ter sido semeado com outro lote de castanha procedente de um souto não atingido pelo parasita, o que, porém, não nos foi possível averiguar. Nestas condições, propuzemos que, a título de experiência, continuasse o referido viveiro a ser semeado com castanha da região e que para aqueles que ainda se encontravam isentos da doença fosse utilizada a proveniente de uma área não infectada, como, por exemplo, a de Bragança;

2) — Apesar de, nos anos seguintes ao de 1941, se ter observado o que atrás referimos, os viveiros até então em boas condições sanitárias apareceram igualmente infectados, como aconteceu em muitos da 2.ª Circunscrição Florestal e em vários outros das Administrações do Norte. De facto, quando no Verão de 1944 fizemos a inspecção fitosanitária dos viveiros florestais, fomos encontrar os da referida Circunscrição infectados na sua totalidade. Dos 29 viveiros inspeccionados, apenas 3 vimos isentos da doença, estando incluídos neste número 2 da Serra da Padrela.

Em face destas circunstâncias, que não dão consistência à teoria atrás apresentada, parece-nos mais lógico e aceitável o seguinte:

1) — Possìvelmente, embora não saibamos como explicá-lo concretamente, mas talvez devido à proximidade de arvoredo doente deu-se a infecção primária de um dos viveiros das Administrações do Norte, ignorando, porém, de qual deles. Podia mesmo dar-se o facto de não ter sido de nenhum destes mas antes de um dos viveiros dos Horticultores «Moreira da Silva & Filhos, L.ª», que sabemos estar infectado e onde os Serviços Florestais costumam abastecer-se de plantas;

2) — Uma das camionetas dos Serviços Florestais transportou a um dos Perímetros plantas de castanheiro, ou de outras essências, provenientes de um ou de outro dos referidos viveiros, sendo absolutamente natural que na terra que se desprendeu das raízes

das mesmas houvesse esporos sexuais do fungo, ou mesmo clamidósporos, infectando, assim, a camioneta;

3) — Seguidamente, essa mesma camioneta, conduzindo de Vila Pouca de Aguiar para as diferentes Administrações a castanha destinada a semente, quer a granel quer ensacada, assim levaria a vários viveiros, na poeira que fàcilmente aderiu às sacas ou á própria castanha, o agente da doença;

4) — As plantas provenientes desses viveiros continuaram a infectar as várias camionetas dos Serviços Florestais e assim têm conduzido o parasita, nas suas formas de resistência, a outros viveiros, quando as mesmas para lá transportam a castanha, ainda que procedente de regiões onde a doença não existe, ou até outras sementes;

5) — O facto de o viveiro de «Tinhela» não estar ainda infectado talvez pudesse ser atribuído a ser a furgoneta local e não as mencionadas camionetas que têm transportado para lá a castanha, a qual, muitas vezes, também aí tem sido conduzida nos meios de transporte dos próprios fonecedores. Parece-nos, no entanto, estranho como ainda não se deu a infecção deste viveiro e do que lhe fica próximo — o viveiro de «Parada do Corgo» (1) — pois que certamente aquelas têm levado para a respectiva Administração outras sementes.

Como se compreende, estas considerações não passam de suposições baseadas em factos observados e não em dados concretos. A sua veracidade não pode pois ser garantida, procurando-se, todavia, a melhor explicação para o caso.

Em resumo seja como fôr, o que nos parece é que não restam dúvidas de que o agente da doença tem sido artificialmente transportado a diversos viveiros florestais, sem dúvida por intermédio das sementes que neles têm sido utilizadas, assim como temos de admitir para estas a existência de uma fonte de infecção de origem recente, renovando-se, para isso, necessàriamente todos os anos e ocorrendo quando se efectua o transporte das mesmas para os referidos viveiros.

Estes factos revestem, pois, grande importância visto que do seu conhecimento depende a preservação dos viveiros ainda isentos

(1) Por considerarmos muito difícil, se não impossível, preservar este viveiro desde que o de «Tinhela» aparecesse infectado, também ele tem sido semeado com castanha colhida na região.

da terrível doença ou dos que venham a ser construídos, como aquele que se pretende localizar na região de Bragança para o fornecimento gratuito de plantas de castanheiro manso aos particulares, conforme está previsto no «Plano de reconstituição, valorização e defesa dos soutos portugueses», recentemente aprovado.

Além disso, julgamos que as notas que aqui inserimos possam contribuir para um mais perfeito conhecimento da biologia dos organismos responsáveis pela infecção, especialmente no que diz respeito aos esporos sexuais e, em particular, aos clamidósporos cuja função, como atrás referimos, não está ainda bem definida. Igualmente supomos que estes apontamentos constituam o ponto de partida para futuras investigações sobre este último assunto.

NOTES ON THE APPEARING OF THE «INK DISEASE» OF THE CHESTNUT TREE IN THE FOREST SERVICE NURSERIES

SUMMARY

In 1941, the author started research on the «ink disease», which had the year before already caused extensive damage in the chestnut (*Castanea sativa* Mill.) plots in several of the Forest Service nurseries in the north of the country. When these nurseries were thoroughly inspected the walnut (*Juglans regia* L.) plots were also found to have been affected.

From the material then collected two parasitic fungi were isolated, which at first were thought to be strains of *Phytophthora cambivora* (Petri) Buis., but having been found to be considerably divergent in their morphology, biology and degree of pathogenicity, they were provisionally named *Phytophthora A* and *Phytophthora B*.

The *Phytophthora A*, the most virulent and the most frequently encoutered, was at the time (1941) also isolated from young plants of *Pseudotsuga Douglasii* Carr. and of *Quercus Robur* L., some time after (1943) from *Q. Suber* L. and later (1944) from *Betula alba* L. This parasite is identical with the one which was isolated by Urquijo (Spain).

The *Phytophthora B*, has up to now only been isolated from the chestnut and is similar to the fungus described by Allain (France).

In other papers recently published the morphology, biology and physiology of these two organisms have been discussed in some detail. Notwithstanding it should here again be mentioned that, through these investigations, the author is to a certain degree sharing, and in some particulars even supplementing, the latest findings by Urquijo. Also, having arrived at the conclusion that there are too many divergencies in the literature on the *P. cambivora* regarding the morphological and biological aspects, he recognises as most opportune the idea of having its taxonomy revised. The position now is that, while it is expected that Urquijo, who has the priority in this respect, will introduce a simplification by separating various organisms up to now considered as strains and varieties of *P. cambivora*, among those he has been treating, with a view to form a new species of *Phytophthora*, the author, by reason of a certain analogy which he believes to exist between his own *Phytophthora A* and the *P. cinnamomi* Rands, — now regarded as a strain of *P. cambivora* — is at the same time contemplating the possibility of having this last one reintegrated as a well-defined species. Research is proceeding in this direction.

The object of this paper being the inquiry into the causes of the occuring of the disease in the nurseries, what are chiefly considered here are the actual circumstances involved in the propagation of the infection, in view of the biological cycle of the parasite.

In order to protect other nurseries as yet not contaminated, it was obviously of the greatest importance to discover in what manner the infection could have spread therefore, from the information gathered, the author tries to find an explanation.

The simultaneity and suddenness of the attack in nearly all of the Forest Service nurseries in the north, and later in the centre of the country, in the very same years in which they had been sown with chestnuts, should convey the idea that the fungus was probably brought there along with the seeds. These had, as a matter of fact, come from certain natural chestnut groves lying in a region found, when surveyed, to be actually infected. This being so, the suspicion arose that the disease had been disseminated through the interference of man and not by any «natural» way of propagation.

With regard to this last possibility it is true that the pathogen

might easily have made its own way into a few of these nurseries, either from any such diseased natural wood of the neighbourhood or else through the agency of arbustive plants, such as heather (*Erica* spp.), known to be a host, or even of certain herbacious ones, also considered susceptible to *P. cambivora*. It is supposed moreover, that the mycelium of the fungus can travel great distances through the organic matter of the soil, but its progression must of course be relatively very slow.

The circumstances as they presented themselves in this respect were however sufficient reason to make us believe that ours was not such a case of a «natural» process spreading, and that our first supposition was the correct one.

It having thus in principle to be accepted that the seeds had carried the infection, the conditions in which this could have happened had then to be determined.

According to Petri the mycelium cannot penetrate into the tegumen of chestnuts, nor it is likely that zoöspores, the vitality of which is very limited, could be transported along on the smooth shells of these seeds. One had then to consider as the only means of dissemination either the cöspores, known to be resistent to external factors and believed to exist upon the soil of chestnut groves, where the fungus lives as a saprophyte, or the chlamydospores, which the author finds, should by no means be overlocked in this connection. Both these spores, mixed with dust particles, would easily adhere to the shell of chestnuts falling to the wet ground and might thus be transported to any distance.

As obviously there could be no evidence, it was not possible to acertain to what extent this supposition might be taken into consideration.

Two circumstances, disclosed by the 1941 and 1944 inspections, do not give consistency to this theory either. One is the fact that the «ink disease» should suddenly appear in yet other nurseries of the north and centre of the country, where the author in 1941 had used the precaution of having chestnuts imported from a non-infected region. The other is the case of the «Tinhela» nursery in the north, which was found to be free of any infection in 1941 in spite of its close vicinity to «ink-infected» natural groves from which its seed chestnuts have always been taken. If the supposition of the seeds bringing in the infection from nearby

woods were always correct, then this one in all probability should have been the first of the nurseries to suffer contamination. Notwithstanding, on every new inspection it has been found in good sanitary condition, though on the author's suggestion it is being kept as a control plot since 1941, and as such, sown with chestnuts supplied from the customary region.

Further attention had consequently to be given to the matter and another explanation of the various circumstances observed was finally arrived at which seems to be more acceptable and which has led to the conclusion that the source of infection for the seeds arise during transport.

The course of events may have been as follows: A primary infection must in some way have occurred either in one of the forest nurseries — possibly through the neighbouring infected groves, as already pointed out, — or else in one specific commercial nursery, purveyors to the Forest Services, which was also found to be actually infected. Any plants being taken out into the field from one of these infected nurseries on one of the Forest Services motor trucks could easily have contaminated the cars by carrying along sexual spores or even chlamydospores on the earth adhering to the roots. Chestnuts or other seeds when transported in the same truck may have become infected and in their turn have transmitted the infection to the other nurseries, to which they were taken. The process must then have continued and been repeated every time newly infected plants were again brought from such nurseries, whereby other trucks must doubtless have been contaminated and consequently any seed chestnuts carried in them, regardless of their having come from regions as yet free of disease or not.

Here again the «Tinhela» nursery may be an indication for the correctness of these suppositions, for there traffic has a very local character, all transport is confined to their own delivery van and there has apparently been no intercourse with other nurseries.

Whatever may have happened, it is in any case beyond doubt, as had been foreseen from the outstart, that man is the responsible factor in the exceptionally swift and wide spreanding of the disease.

The discovery, besides being of actual value for the planning of measures for the preservation of other nurseries in this country,

is also believed in some manner to afford a contribution to a better knowledge of the biology of the organisms causing the infection, in special with regard to their sexual spores and most particularly to the chlamydospores, the functions of which have as yet not been clearly defined. The author thinks, moreover, that this information may serve as a starting point for future investigations along these lines.

ESTUDOS DE ESTATÍSTICA AGRONÓMICA

III

EFICIÊNCIA RELATIVA DOS DIVERSOS DELINEAMENTOS ESTATÍSTICOS USADOS NA COMPARAÇÃO DE GRANDE NÚMERO DE VARIEDADES

«LATTICES» E «BLOCOS INCOMPLETOS EQUILIBRADOS»

POR *AUGUSTO JOSÉ DE OLIVEIRA*
Estação Agronómica Nacional

1. INTRODUÇÃO

A necessidade de se usarem esquemas estatísticos diferentes dos já familiares «Blocos casualizados» e «Quadrados latinos», em ensaios de campo com grande número de variedades ou híbridos é hoje facto incontroverso. Assim como em 1922 a exigência positiva de contrôle do erro experimental no planeamento e interpretação dos ensaios obrigou FISHER a buscar uma base lógica de «planificação estatística» no duplo aspecto de execução e subsequente análise dos resultados em termos matemáticos, assim também em 1936 outras necessidades experimentais conduziram a novos métodos que, julgamos poder afirmá-lo, revolucionaram igualmente a Estatística, pelo menos nas suas aplicações.

Coube a F. YATES, o sucessor de R. A. FISHER na chefia do Departamento de Estatística da «Estação Experimental de Rothamsted», introduzir essas técnicas que permitem um melhor contrôle da heterogeneidade do solo nos seus efeitos sobre os ensaios e um aumento de eficiência na interpretação dos resultados.

Já em fins de 1944 nos referimos levemente a estas questões (OLIVEIRA, 1945) dizendo logo no primeiro parágrafo que os chamados ensaios de uniformidade serviam (além do mais) para calcular as eficiências dos arranjos «complexos» em relação aos esquemas «simples» e as daqueles entre si.

Dum modo geral, os delineamentos estatísticos obedecem aos requisitos fundamentais de: casualização, repetição e ortogonalidade. Acerca deste último aspecto publicar-se-à, um dia, um outro trabalho; nesta introdução ao estudo dos esquemas Pseudo-Fac-

toriais apenas se deseja frisar que a não-ortogonalidade pode ser introduzida quer por acidente, como nos casos em que falhem alguns talhões ou tratamentos, quer deliberadamente, como consequência do «confundimento» de certos efeitos primários ou interacções. É o que se passa com esses arranjos estatísticos, muitos dos quais vão ser tratados a seguir.

Os esquemas Pseudo-Factorais são, como dissemos, muito importantes, principalmente em certos domínios da Agronomia, como seja em Melhoramento, em que há muitas vezes necessidade de comparar um grande número de «formas» cultivadas, 100, 200 ou mesmo mais. Vejamos a posição que eles ocupam dentro do conjunto do grande grupo de ensaios em curso na Estação Experimental de Rothamsted (COX, 1943):

A. Blocos casualizados completos
   a) Blocos casualizados
   b) Quadrados latinos

B. Experiências factorais
   a) Blocos casualizados
   b) Esquemas com interacções confundidas
   c) Esquemas em talhões fraccionados

C. Delineamentos em blocos incompletos
   a) «Lattices» (*)
   b) Blocos incompletos equilibrados
   c) «Lattices» quadrados e «lattices de YOUDEN»

D. Grupos de experiências uniformes
E. Experiências a longo prazo (rotações, etc.).

Como se sabe, com os blocos casualizados completos todos os tratamentos ou variedades em estudo figuram dentro de cada bloco, todavia o seu número não deve ultrapassar 8 ou 10, como regra geral, a fim de que o terreno incluido em cada bloco não

(*) — Usar-se-à este termo, à falta de tradução portuguesa apropriada.

seja um tanto heterogéneo. Nos esquemas factoriais também o número de tratamentos, em cada bloco, deve ser limitado.

Para comparar um grande número de variedades havia outrora os arranjos com talhões testemunhas, quer sistemàticamente intervalados, quer casualizados, mas desde 1936 os delineamentos preferidos são os do grupo C, por conduzirem a um êrro experimental válido e terem maior eficiência. Deles nos ocuparemos neste trabalho através de exemplos numéricos.

Os delineamentos de blocos incompletos são do tipo quase-factorial, ou melhor, pseudo-factorial (YATES, 1936 a) visto a sua estrutura poder ser derivada dos arranjos factoriais por extensão de conceitos.

Nos «*lattices*» o número de variedades é um quadrado perfeito, $v = k^2$. Essas variedades ficam divididas em 2 ou mais grupos de séries (ou blocos incompletos) que podem formar-se com relativa facilidade, conforme se verá nos primeiros parágrafos do Capítulo seguinte; nestes esquemas o número de combinações (variedades) é um múltiplo do número de talhões em cada bloco incompleto (ou linha, ou coluna, dum quadrado latino).

Nos esquemas em *blocos incompletos equilibrados* cada par de variedades ocorre o mesmo número de vezes nos blocos; os arranjos dizem-se equilibrados porque as comparações entre todos os pares de variedades são da mesma precisão. Um Index de tais delineamentos vem nas Tabelas de FISHER and YATES (1943).

No «*lattice*» *quadrado* as variedades são dispostas em séries que virão a formar as linhas e colunas dum certo número de quadrados latinos; tomando em consideração todos os grupos duma série ortogonal de tais quadrados (FISHER and YATES, 1943; STEVENS, 1939) o delineamento torna-se equilibrado. O «*lattice*» de YOUDEN é uma forma particular dos esquemas de blocos incompletos.

Depois que tais planificações foram propostas em 1936 introduziram-se certas modificações na análise de variância, a fim de se «recuperar» a informação inter-blocos.

Servindo-nos dos resultados de dois ensaios de uniformidade realizados em Sacavém, um com tremôço doce e o outro com batata, vamos apresentar alguns exemplos numéricos elucidativos e, depois, os resultados das eficiências relativas dos mencionados delineamentos complexos.

2. BLOCOS INCOMPLETOS

A teoria relativa a estes arranjos estatísticos vem desenvolvida no citado artigo de YATES (1936 a) e, também, no livro de GOULDEN (1943), onde o assunto é, porém, tratado mais descritivamente e sem quaisquer indicações acerca de pormenores de interêsse prático.

YATES dá-nos a teoria de quase todos os delineamentos de blocos incompletos em comparação com a dos esquemas factoriais, em que se incluem as combinações possíveis de 2 ou mais factores. No caso numérico, que será tratado na alínea seguinte, com 64 variedades fictícias constituindo um «*lattice*» *simples* (em 2 grupos de blocos, cada grupo com 2 repetições) sobreposto a um ensaio de uniformidade, suporemos que há 2 factores, cada um com 8 níveis, cujas combinações possíveis perfazem 64 números de identificação, dispostos em quadrado, conforme se mostra na Tabela I:

TABELA I

REPRESENTAÇÕES EQUIVALENTES (64 VARIEDADES)

A):									B):								
	11	12	13	14	15	16	17	18		1	2	3	4	5	6	7	8
	21	22	23	24	25	26	27	28		9	10	11	12	13	14	15	16
	31	32	33	34	35	36	37	38		17	18	19	20	21	22	23	24
	41	42	43	44	45	46	47	48		25	26	27	28	29	30	31	32
	51	52	53	54	55	56	57	58		33	34	35	36	37	38	39	40
	61	62	63	64	65	66	67	68		41	42	43	44	45	46	47	48
	71	72	73	74	75	76	77	78		49	50	51	52	53	54	55	56
	81	82	83	84	85	86	87	88		57	58	59	60	61	62	63	64

Cada variedade é assim representada por cada combinação particular dos dois factores, um a 8 níveis correspondentes às linhas (os números da esquerda da Tabela 1_A) e o outro, também a 8 níveis, representando as colunas (números da direita da Tabela 1_A). Na hipótese dum ensaio factorial com dois factores, X e Y, cada um a 8 níveis, o fraccionamento dos 63 graus de liberdade (g. l.) seria assim:

Efeito principal do primeiro factor, X . . . 7 g. l.
Efeito principal do segundo factor, Y . . . 7 g. l.
Interacção dos dois factores, $X \times Y$ . . . 49 g. l.

Ora, como se sabe, os 49 g. l. da interacção podem também ser separados em 7 componentes ortogonais, cada um com 7 g. l.; e, então, os 63 g. l. fraccionam-se em 9 grupos, cada um com 7 graus de liberdade. Portanto, no «*lattice*» *simples* com 2 grupos X e Y, com os blocos incompletos do grupo X formados pelas variedades que entram nas linhas (Tabela I), e com os do grupo Y pelas variedades que entram nas colunas, dá-se o «confundimento», aliás parcial (YATES, 1937), dos efeitos primários com os efeitos dos blocos, ficando por «confundir» os 49 g. l. da mencionada interacção.

Se se empregarem os 9 grupos da série ortogonal de tais quadrados (FISHER and YATES, 1943), isto é, se em cada repetição um diferente grupo de 7 g. l. fôr «confundido» com blocos, então, quer os efeitos principais, quer as interacções serão igualmente «confundidas», e o delineamento diz-se *equilibrado*. Dado aqui o «confundimento» parcial, tais efeitos e interacções serão determinados com 8 9 da precisão que resultaria, caso não houvesse nenhum «confundimento».

Conforme já foi dito, é este o princípio em que assenta a teoria dos delineamentos de blocos incompletos, presumindo-se, entretanto, que o erro experimental seja diminuido pelo processo indicado (pelo qual há redução da grandeza dos blocos de 64 para 8 variedades, no exemplo citado) o que, aliás, é confirmado pela prática.

Referimo-nos ao caso duma representação a duas dimensões e com dois grupos de séries para o «*lattice*» *simples*, ou 9 grupos de séries para os delineamentos equilibrados. Mas podem fazer-se outras representações, como sejam as tri-dimensionais para os «*lattices*» *cúbicos* etc. Os «*lattices*» também podem ser do tipo $k \times l$ ou, ainda, $k \times l \times m$.

Eis a seguir alguns exemplos numéricos apresentados duma maneira sumária, mas permitindo fazer uma ideia dos processos de conduzir a análise de variância, de obter as médias corrigidas das variedades, e de determinar as eficiências relativas, etc.

a) *Delineamentos em «lattices»*

Exemplifica-se aqui o «*lattice*» *simples* para a comparação de 64 variedades, em 4 repetições, usando os dados do ensaio de uniformidade com *Lupinus luteus* L., que, aliás, são de valor restrito

(OLIVEIRA, 1945), dispondo-se o arranjo estatístico conforme figura no QUADRO A.

Os 8 blocos incompletos de cada um dos grupos X e Y são constituidos, respectivamente, pelas linhas e colunas do Quadrado B da Tabela I, com a única diferença de que os blocos entre si e as variedades dentro de cada bloco estão casualizados, como é de preceito. Cada talhão é constituído por uma única linha de tremôço com 5 metros de comprimento; os blocos foram

TABELA II

COMBINAÇÃO DAS REPETIÇÕES (TREMOÇAL DE SACAVÉM)

Grupo X (Rep. 1 + 4)								Total
1	2	3	4	5	6	7	8	
226	208	236	236	230	200	245	233	1814
9	10	11	12	13	14	15	16	
229	225	260	218	251	256	240	205	1884
..	..	..	..	..	..	..	..	..
..	..	..	..	..	..	..	..	..
57	58	59	60	61	62	63	64	
252	233	354	271	300	313	289	309	2321
Totais das colunas:								
1949	1859	2071	1950	2048	2001	1947	1928	15753

Grupo Y (Rep. 2 + 3)								Total
1	9	17	25	33	41	49	57	
291	287	322	250	282	301	237	251	2221
2	10	18	26	34	42	50	58	
274	377	226	244	289	212	335	245	2202
..	..	..	.	..	..	..	..	..
..	..	..	..	..	..	..	..	..
8	16	24	32	40	48	56	64	
213	198	218	227	186	214	188	219	1663
Totais das colunas:								
1779	1993	1963	1945	2027	1871	1945	1790	15313

QUADRO A

«LATTICE SIMPLES», DE 64 VARIEDADES, SOBREPOSTO NUM ENSAIO DE UNIFORMIDADE (OLIVEIRA, 1945) COM *LUPINUS LUTEUS* L.

Linha		Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Série 7	Série 8	
1		(47) 66	(32) 66	(52) 81	(17) 89	(3) 90	(58) 109	(5) 79	(12) 61	
2		(43) 97	(29) 106	(53) 98	(24) 122	(43) 97	(42) 115	(61) 78	(20) 78	
3		(45) 111	(26) 136	(56) 107	(21) 120	(51) 130	(18) 101	(21) 74	(4) 74	
4		(48) 96	(25) 124	(50) 114	(20) 118	(11) 111	(2) 135	(29) 93	(36) 73	
5		(46) 63	(28) 138	(51) 106	(23) 125	(59) 115	(26) 125	(53) 147	(60) 82	
6		(42) 68	(30) 95	(49) 100	(19) 137	(19) 244	(50) 226	(37) 127	(44) 112	
7		(44) 63	(27) 110	(55) 117	(22) 142	(35) 267	(10) 207	(13) 181	(28) 119	
8		(41) 86	(31) 133	(54) 128	(18) 117	(27) 234	(34) 159	(45) 149	(52) 143	
	X_1									Y_3
9		(36) 98	(12) 63	(4) 100	(59) 144	(1) 201	(62) 165	(7) 138	(32) 126	
10		(39) 81	(16) 44	(2) 107	(61) 138	(9) 175	(14) 199	(15) 163	(16) 107	
11		(34) 79	(9) 74	(6) 106	(58) 118	(17) 237	(22) 175	(31) 118	(8) 127	
12		(38) 100	(10) 87	(1) 116	(57) 147	(33) 185	(6) 168	(39) 135	(24) 98	
13		(33) 92	(11) 110	(3) 141	(62) 152	(41) 187	(54) 178	(47) 180	(48) 110	
14		(35) 72	(15) 80	(7) 98	(63) 139	(49) 156	(38) 190	(63) 149	(40) 112	
15		(37) 71	(14) 81	(8) 113	(60) 139	(57) 149	(46) 185	(55) 158	(64) 106	
16		(40) 78	(13) 77	(5) 102	(64) 148	(25) 145	(30) 205	(23) 159	(56) 97	
17		(63) 78	(62) 79	(8) 86	(2) 139	(10) 138	(37) 236	(50) 107	(3) 95	
18		(31) 60	(22) 105	(24) 120	(58) 136	(13) 174	(34) 180	(51) 93	(6) 94	
19		(47) 80	(38) 94	(56) 91	(10) 170	(15) 160	(40) 192	(55) 130	(2) 101	
20		(39) 82	(46) 62	(40) 74	(42) 97	(9) 155	(36) 185	(49) 145	(8) 120	
21		(15) 90	(30) 65	(16) 91	(50) 109	(16) 161	(33) 182	(54) 130	(7) 147	
22		(23) 69	(54) 78	(48) 104	(26) 119	(12) 155	(35) 195	(53) 156	(1) 110	
23		(7) 73	(6) 70	(32) 101	(18) 125	(11) 150	(39) 156	(56) 105	(5) 128	
24		(55) 71	(14) 71	(64) 113	(34) 130	(14) 175	(38) 154	(52) 128	(4) 136	
	Y_2									X_4
25		(3) 85	(52) 75	(1) 90	(29) 142	(30) 154	(61) 162	(22) 137	(43) 103	
26		(11) 53	(36) 85	(25) 105	(45) 108	(32) 158	(59) 210	(18) 104	(48) 122	
27		(59) 63	(12) 70	(57) 102	(61) 139	(28) 150	(64) 161	(17) 125	(41) 117	
28		(43) 92	(60) 127	(41) 114	(13) 132	(31) 170	(58) 115	(20) 143	(44) 121	
29		(27) 101	(20) 80	(33) 97	(37) 137	(27) 193	(63) 150	(21) 115	(42) 123	
30		(19) 76	(44) 79	(49) 81	(5) 171	(26) 165	(60) 132	(24) 135	(46) 129	
31		(35) 80	(4) 53	(17) 85	(53) 135	(25) 182	(57) 105	(19) 115	(47) 102	
32		(51) 70	(28) 87	(9) 112	(21) 137	(29) 166	(62) 161	(23) 93	(45) 88	
33		75	109	88	154	140	115	108	82	
34		88	91	112	109	124	104	89	101	
35		75	85	99	132	126	107	109	67	
36		74	107	103	133	115	96	120	65	
37		102	119	122	127	107	113	100	93	
38		69	100	115	107	106	100	105	82	
39		66	58	97	130	113	115	115	58	
40		60	59	90	101	79	96	94	71	

NOTA — Produção, em gramas, de cada linha de 5 m. Entre parêntesis os n.os das variedades.

dispostos no sentido da maior homogeneidade do terreno. Com os dados daquele Quadro é fácil constituir os grupos da Tabela II.

Vejamos como se fazem os cálculos necessários à análise de variância, no caso em que se pretenda efectuar uma estimativa da variância inter-blocos (cox *et al.*, 1940) e corrigir as médias das variedades, a fim de que as comparações intra-blocos e inter-blocos sejam ponderadas segundo as suas precisões relativas.

As somas de quadrados (s. q.) para Total, Repetições e Variedades (ignorando blocos) calculam-se pela maneira usual. Por exemplo, para Total será (v. Quadro A):

$$(66)^2 + (97)^2 + \ldots + (88)^2 - \frac{(31066)^2}{256} = 410472{,}36 \quad \text{(Tabela IV)}$$

e para Variedades (Tabela II: Var. $1 = 226 + 291 = 517$; etc.):

$$\frac{(517)^2 + \ldots + (528)^2}{4} - \frac{(31066)^2}{256} = 63069{,}86 \quad \text{(63 g. l.)}$$

Na soma de quadrados para Blocos (eliminando variedades) interessa descriminar os dois componentes a) e b). Para se obter o componente a) é preciso formar, por cada grupo X e Y, as séries das diferenças dos totais dos blocos contendo as mesmas variedades; por exemplo, para os blocos do grupo X, que incluem as variedades 1, 2, ... 8 será: $883 - 931 = -48$. Tais séries figuram na Tabela III_A.

Para o cálculo do componente b), que é constituido por duas séries de diferenças (quantidades rkc_x e rkc_y) dando uma estimativa da produção dos blocos livre dos efeitos das variedades, recorre-se aos totais da Tabela II. Por exemplo, o total 1814 contem as variedades 1, 2, ... 8; ora uma estimativa da soma das produções dessas mesmas variedades é dada pelo total 1779 (grupo Y), a qual não está «confundida» com blocos, visto que cada bloco é igualmente representado nesse total. E ter-se-à, então, para este caso:

$$1814 - 1779 = +35$$

Estas séries de diferenças, registadas com o sinal contrário para facilitar o cálculo do «ajustamento» às variedades, figuram na Tabela III_B.

TABELA III

SÉRIES DE DIFERENÇAS (*«Lattice» Simples*)

A. Componente a)		B. Componente b)	
X	Y	rkc_x	rkc_y
— 48	— 649	— 35	— 272
— 652	— 152	+ 109	— 343
+ 3	— 668	+ 26	+ 163
— 430	— 86	— 301	+ 552
— 809	+ 173	— 124	+ 19
— 255	— 841	+ 316	— 88
— 143	— 597	+ 100	+ 144
— 71	— 103	— 531	+ 265
— 2405	— 2923	— 440	+ 440

As s. q. para estes dois componentes de Blocos (eliminando variedades) são respectivamente:

$$\frac{(-48)^2 + \ldots + (-103)^2}{16} - \frac{(-2405)^2 + (-2923)^2}{128} = 98029{,}48$$

$$\frac{(-35)^2 + \ldots + (+265)^2}{32} - \frac{(-440)^2 + (+440)^2}{256} = 33910{,}88$$

TABELA IV

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DUM *«Lattice» Simples* (TREMOÇAL DE SACAVÉM)

Origem da variação	g. l.	Somas de quadrados	Quad. médios
Repetições	3	112693,29	37564,43
Blocos (eliminando var.) . . .	28	131940,36	4712,16
componente a) . . .	14	98029,48	
componente b) . . .	14	33910,88	
Var. (ignorando blocos) . . .	63	63069,86	1108,89
Erro (por diferença)	161	102768,85	638,32
Total	255	410472,36	—
Erro (Blocos completos) . . .	189	234709,21	1241,85

A s. q. para Erro (161 g. l.) obtem-se por diferença. Na Tabela IV figura a análise de variância do «*lattice*» estudado; na última linha incluiu-se o valor correspondente a Erro, na hipótese de se efectuar o ensaio em Blocos completos.

A teoria matemática do teste exacto de significância das diferenças entre as médias corrigidas das variedades é um tanto complexa, mas vem na 2.ª Parte do folheto de Cox *et al.* (1940); para o nosso caso, feitos os cálculos, conclui-se que o ensaio não é significativo, o que era algo de esperar visto tratar-se dum ensaio de uniformidade. Muitas vezes um teste aproximado revela ràpidamente essa significância, dispensando-se então o teste exacto.

Para se *ajustarem* as médias das variedades, pela introdução de correcções apropriadas por causa dos efeitos particulares dos blocos em que essas variedades recaíram, é preciso calcular:

$w = 1/E = 1/(638{,}32) = 0{,}001567$

$w' = 3/(4B - E) = 3/(4 \times 4712{,}16 - 638{,}32) = 0{,}000165$;

e sendo o factor de ponderação igual a: $(w - w')/(w + w') = 0{,}8095$ os coeficientes de correcção determinam-se assim:

$$c_x' = \frac{w - w'}{rk\ (w + w')}\ rkc_x = (0{,}0253)\ rkc_x\ ;\ c_y' = (0{,}0253)\ rkc_v\ .$$

Por exemplo, para a variedade 1, cuja média é 129,25 (= 517/4), a nova média, introduzidas as respectivas correcções (v. Tabela III), terá o valor:

$$129{,}25 + (0{,}0253)\ (-35) + (0{,}0253)\ (-272) = 121{,}48$$

Quanto aos *erros padrões* das diferenças entre tais médias ajustadas, há a considerar os dois casos seguintes:

1. as variedades pertencem ao mesmo bloco
2. as variedades pertencem a blocos distintos.

Sempre que possível, toma-se muitas vezes um erro padrão médio (ponderado) para todas as comparações:

$$\sqrt{\frac{2\ s^2}{r\ (k+1)}\left[\frac{4\ w}{w + w'} + (k-1)\right]} = \sqrt{\frac{2}{4}\ (753{,}392)} = \sqrt{376{,}696} = 19{,}41$$

O *desvio padrão efectivo* (erro experimental), em % da média geral, de 1 talhão é: $(\sqrt{753{,}392})\ (100)/(121{,}35) = 22{,}6\ \%$.

Finalmente, quanto à *precisão* do *«lattice» simples*, em relação a um delineamento hipotético de blocos completos que ocupasse a mesma área e tivesse o mesmo número de repetições, nos dois casos: sem e com recuperação da informação inter-blocos, ter-se-à respectivamente:

$$\frac{(2/4)\ (1241{,}85)\ (100)}{(2/4)\ (11/9)\ (638{,}32)} = 159\ \%;\quad \frac{(2/4)\ (1241{,}85)\ (100)}{(376{,}696)} = 165\ \%\ \text{(Tabela X)}.$$

Quer dizer, a redução da grandeza dos blocos de 64 para 8 variedades deu um aumento de precisão de 65 %, àparte pequenas perdas de informação (cox *et al.*, 1940), isto é, para se obterem resultados da mesma precisão seriam necessárias 6 repetições com os blocos completos.

O delineamento aqui tratado é o mais simples dos *«lattices»*; os do tipo $k \times l$ (l pouco diferente de k) são menos vulgares. Viu-se que cada grupo foi repetido duas vezes, mas poder-se-iam ter usado 3 ou mais repetições, todavia, neste último caso devem antes aconselhar-se os denominados *«lattices» triplos*, com 3 grupos de séries.

Se para $v = k^2$ em vez de 2 grupos de blocos se empregarem 3, chamando-se ao 3.º o grupo Z, de tal modo que os 3 grupos mantenham entre si as mesmas relações de ortogonalidade, isto é, que cada série de cada grupo contenha uma e só uma variedade de cada série dos outros dois grupos, obter-se-à o *«lattice» triplo* que mais não é do que um arranjo bi-dimensional, mas a 3 grupos de séries.

A vantagem de se usar este 3.º grupo está em que o «factor de eficiência» aumenta em relação ao dos *«lattices» simples*, passando de $(k+1)/(k+3)$ para $(k+1)/(k+2{,}5)$, isto para o caso de não haver recuperação da informação inter-blocos; é claro que no outro caso há também acréscimo de precisão.

Os *«lattices» equilibrados* podem incluir-se na família dos delineamentos de blocos incompletos equilibrados, que estudaremos na alínea seguinte.

Se em vez de representações a duas dimensões, como as que têm sido até aqui tratadas (v. Tabela I), construirmos uma

Tabela de tripla entrada, tal estrutura corresponderá à dum cubo (ou cuboide) e, por isso, os respectivos lattices se denominam *«lattices» cúbicos.*

As k^2 linhas destes *«lattices»* em qualquer das 3 direcções, dividem as variedades em k^2 séries, cada uma contendo k variedades, dando assim lugar aos três grupos U, V e W; cada grupo de séries poderá formar uma repetição no terreno, num conjunto de k^2 blocos casualizados com k talhões cada um.

A Fig. 1 mostra-nos um *«lattice»* $3 \times 3 \times 3$ para 27 variedades, e, nela, cada uma das variedades é representada por 3 algaris-

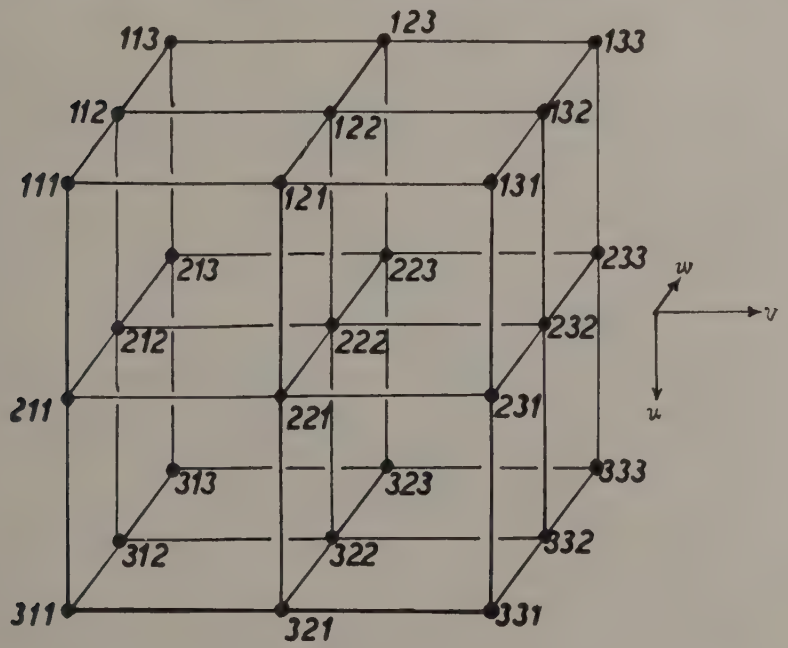


Fig. 1 (YATES, 1940)

mos juntos, fazendo-se assim ressaltar a analogia com o esquema factorial de 3 factores *U*, *V* e *W*, cada um a 3 níveis ou doses.

A partir desta representação do *«lattice» cúbico*, outros agrupamentos podem ser gerados, dando origem a novos arranjos estatísticos. Deve dizer-se que os delineamentos em *«lattice» cúbico* requerem cálculos fastidiosos, dado o número e complexidade das Tabelas que é preciso formar (YATES, 1939).

No campo devem casualizar-se, quer os talhões dentro dos blocos (incompletos), quer estes entre si, convindo, também, que cada grupo forme um todo homogéneo. Em geral este delineamento é o indicado para ensaios comparativos com grande número de variedades, embora em número fixo, múltiplo de 5, 6, etc., havendo já um estudo com 729 ($=9\times 9\times 9$) «linhas» de plantas florestais de viveiro (DAY and AUSTIN, 1939). No seu Relatório final MÁRIO R. DE CARVALHO (1945) descreve um arranjo teórico com $k^3=125$ tratamentos.

b) *Blocos incompletos equilibrados*

Conforme já foi dito, nos esquemas equilibrados todas as comparações entre os diversos tratamentos (variedades) se fazem com a mesma precisão. Sob o aspecto agronómico são particularmente importantes os delineamentos para $v=(k^2+k+1)$ variedades quando dispostas em blocos incompletos de $k+1$ talhões, e com $k+1$ repetições. É o caso do arranjo para $v=31$ variedades, com 6 repetições (veja-se na alínea seguinte outra forma especial deste arranjo).

A estrutura dos delineamentos em blocos incompletos equilibrados está dependente da das séries ortogonais de $k\times k$ quadrados latinos. As Tabelas de FISHER and YATES (1943) trazem um Index destas planificações e desenvolvem um exemplo numérico com recuperação da informação inter-blocos.

No exemplo que vamos tratar, com dados dum ensaio de uniformidade dum batatal (QUADRO B) — e ao qual se fará maior referência noutro Capítulo — suporemos $v=25$ variedades. Recorrendo àquelas Tabelas obteem-se as seguintes indicações:

variedades, $v=k^2=25$
repetições, $r=6$
blocos incompletos, $b=30$
unidades por bloco, $k=5$
referência, o. s. = «orthogonal square».

Acompanhar-se-à aqui, passo a passo, o artigo de WELHAUSEN (1943). Formemos uma tabela com a seguinte estrutura ($G=11249$):

QUADRO B

DELINEAMENTO DE BLOCOS INCOMPLETOS EQUILIBRADOS, PARA 25 VARIEDADES, SOBREPOSTO NUM ENSAIO DE UNIFORMIDADE COM UM BATATAL (SACAVÉM).

Linha	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Repetições
1	(2) 70	(9) 83	(7) 78	(22) 76	(25) 61	
2	(24) 58	(12) 84	(18) 74	(8) 44	(17) 65	
3	(10) 55	(1) 81	(21) 71	(11) 64	(3) 64	IV
4	(16) 67	(23) 91	(15) 83	(5) 76	(14) 68	
5	(13) 72	(20) 78	(4) 78	(19) 72	(6) 62	
6	(4) 66	(12) 75	(21) 78	(8) 54	(17) 52	
7	(5) 58	(14) 72	(24) 86	(9) 64	(16) 65	
8	(3) 87	(11) 69	(22) 85	(10) 63	(19) 67	I
9	(1) 75	(13) 66	(25) 93	(7) 76	(20) 69	
10	(2) 66	(15) 94	(23) 93	(6) 72	(18) 69	
11	(10) 82	(14) 78	(9) 81	(7) 71	(5) 76	
12	(17) 70	(20) 73	(3) 79	(13) 62	(18) 74	
13	(4) 63	(21) 86	(15) 81	(25) 85	(24) 74	III
14	(23) 74	(2) 79	(16) 81	(1) 63	(12) 66	
15	(11) 78	(8) 78	(22) 79	(19) 79	(6) 62	
16	(14) 70	(4) 86	(10) 73	(15) 65	(11) 61	
17	(7) 72	(6) 75	(12) 89	(1) 68	(18) 66	
18	(16) 86	(13) 85	(19) 79	(8) 75	(25) 60	V
19	(23) 68	(20) 82	(3) 80	(17) 75	(9) 69	
20	(5) 82	(22) 88	(21) 67	(24) 69	(2) 78	
21	(3) 77	(16) 94	(19) 77	(13) 76	(1) 84	
22	(7) 81	(12) 84	(23) 75	(17) 74	(18) 68	
23	(11) 95	(25) 98	(15) 86	(21) 85	(22) 76	VI
24	(24) 85	(4) 92	(6) 85	(5) 88	(10) 74	
25	(20) 66	(8) 80	(2) 82	(9) 70	(14) 62	
26	(8) 86	(6) 94	(15) 92	(9) 68	(2) 70	
27	(23) 79	(21) 83	(20) 76	(14) 63	(7) 60	
28	(3) 84	(1) 94	(10) 71	(4) 67	(17) 59	II
29	(13) 73	(16) 94	(5) 75	(19) 76	(22) 56	
30	(18) 81	(11) 82	(25) 85	(24) 70	(12) 66	
31	68	75	89	76	71	
32	64	75	79	59	60	
33	80	81	73	66	68	
34	71	85	88	75	60	
35	80	77	80	77	56	
36	86	74	81	72	68	
37	80	88	66	63	62	
38	73	80	74	69	60	
39	68	89	63	61	61	
40	87	95	74	63	73	

NOTA — Produção, em decagramas, de cada linha com 5m. Entre parêntesis os n.os das variedades.

TABELA V

ARRANJO DOS DADOS (BATATAL DE SACAVÉM).
BLOCOS INCOMPLETOS EQUILIBRADOS, 25 VARIEDADES

	Blocos imcompletos							Var., V	Blocos	W
Var.	1	2	3	4	5	..	30	Total	SB	$5V + G\,6SB$
1	75					..		465	2292	— 178
2	66					..		445	2118	+ 766
3	87					..		471	2268	— 4
4	66					..		452	2311	— 357
5	58					..	88	455	2206	+ 288
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..
24						..		442	2209	+ 205
25						..		482	2296	— 117
Total	352	329	376	322	435	..	393	11249	—	0

Os cálculos para a análise de variância fazem-se da maneira usual. Para Blocos (eliminando variedades) é necessário acumular os quadrados das quantidades W da última coluna da Tabela V, e dividir o resultado por $(k+1)\,k^3 = 750$, ou seja:

$$\frac{(-178)^2 + (+766)^2 + \ldots + (-117)^2}{750} = 6466{,}24 \text{ (24 g. l.)}$$

O valor correspondente a Erro (96 g. l.) obtem-se por diferença. Damos a seguir a Tabela VI com a análise de variância; na última linha figura o valor para Erro (120 g. l.) admitindo que o ensaio se fez em blocos completos.

TABELA VI

ANÁLISE DE VARIÂNCIA, BLOCOS INCOMPLETOS EQUILIBRADOS (BATATAL)

Origem da variação	g. l.	s. q.	q. m.
Repetições	5	1357,31	271,46
Blocos (eliminando variedades) . .	24	6466,24	269,43
Variedades (ignorando blocos) . .	24	2477,82	103,24
Erro (por diferença)	96	5021,62	52,31
Total	146	15322.99	—
Erro (Blocos completos)	120	11487,86	95,73

Para se corrigirem os totais (ou médias) das variedades, tomando em linha de conta a informação inter-blocos, calcula-se primeiramente o valor de λ, que se obtem assim: $\lambda = (M' - M) / (k M') = (269{,}43 - 52{,}31) / (5 \times 269{,}43) = 0{,}1612$. Para a variedade 1, por exemplo, obtem-se o seguinte total corrigido:

$$465 + (0{,}1612)\ (-178) / 5 = 459{,}3$$

A *variância efectiva do erro experimental* é: $(1 + \lambda)\ (52{,}31) = 60{,}74$. O erro padrão, médio, da diferença entre quaisquer duas médias ajustadas de variedades será então: $\sqrt{(2)\ (60{,}74) / 6} = \pm 4{,}50$. O erro experimental, em % da média, é: 10,4 %.

Quanto à *eficiência* deste delineamento, no caso mais vantajoso com a informação inter-blocos recuperada, ter-se-á:

$$(95{,}73)\ (100) / 60{,}74 = 158\ \%$$

(Este mesmo esquema, mas numa outra posição, deu a eficiência: 153 %; a média das duas é que figura na Tabela X).

No caso de não se recuperar aquela informação inter-blocos a eficiência será apenas de 152 %. Deve acrescentar-se que, no primeiro caso, há pequenas perdas de informação, uns 2 ou 3 % quando muito.

Conforme dissemos, os *«lattices» equilibrados* fazem também parte dos delineamentos desta família. Falta ainda dizer que nas Tabelas de FISHER and YATES (1943) e no livro de GOULDEN a análise de variância é conduzida doutro modo, todavia as conclusões acerca do ensaio são as mesmas.

c) *«Lattice» quadrado e «Lattice» de YOUDEN*

No *«lattice» quadrado* em que $v = k^2$, é possível utilizar plenamente as vantagens dos quadrados latinos (pois que o controle da heterogeneidade do solo, ou do «material» em estudo — WADLEY, 1946 — se faz, também, em dois sentidos) além de todas as outras vantagens já apontadas a propósito dos esquemas de blocos incompletos.

Nos *«lattices» quadrados* equilibrados, profundamente tratados por YATES (1940), quando h é impar são necessários $(k + 1) / 2$ quadrados ou repetições, mas, quando é par, o número de repetições será maior, pois cada grupo de séries deve ser incluido duas vezes, dando então $(k + 1)$ quadrados. Note-se, desde já, que não podem usar-se tais *«lattices»* para 36, 100 ou 144 variedades.

O número destes delineamentos é assim um tanto restrito, com a agravante do número de repetições exigido ser por vezes elevado. Posteriormente COCHRAN (1943) apresentou um grupo adicional de *«lattices» quadrados* que, embora não equilibrados, resolvem a questão, apenas com ligeiras modificações nos cálculos.

No campo, cada repetição deve formar um conjunto homogéneo, e as linhas de cada quadrado devem casualizar-se entre si bem como as colunas, a fim de que o erro experimental seja válido. Vamos apresentar, e também sumàriamente, um exemplo numérico, usando os dados do Quadro B, mas na suposição dos talhões do batatal terem 5 metros de comprimento, e largura que compreenda duas filas de plantas. Na seguinte Tabela figuram esses dados, mas ùnicamente na parte abrangida pelo delineamento em estudo, e entre parêntesis os números das variedades.

TABELA VII

«LATTICE» QUADRADO, 25 VARIEDADES E 3 REPETIÇÕES, SOBREPOSTO A UM ENSAIO DE UNIFORMIDADE (BATATAL DE SACAVÉM). TALHÕES COM 2 LINHAS

II	(18) 128	(6) 167	(12) 152	(5) 120	(24) 126	693
	(7) 122	(25) 172	(1) 154	(19) 140	(13) 132	720
	(15) 138	(3) 153	(9) 156	(22) 126	(16) 114	687
	(4) 145	(17) 141	(23) 171	(11) 127	(10) 132	716
	(21) 141	(14) 160	(20) 186	(8) 148	(2) 138	773
	674	793	819	661	642	3589
III	(2) 152	(9) 151	(11) 160	(18) 133	(25) 150	746
	(19) 137	(21) 165	(3) 162	(10) 148	(12) 140	752
	(6) 148	(13) 164	(20) 152	(22) 144	(4) 123	731
	(23) 158	(5) 160	(7) 168	(14) 143	(16) 126	755
	(15) 150	(17) 170	(24) 147	(1) 144	(8) 147	758
	745	810	789	712	686	3742
I	(12) 158	(11) 178	(14) 152	(15) 150	(13) 152	790
	(7) 180	(6) 190	(9) 171	(10) 173	(8) 150	864
	(22) 152	(21) 174	(24) 174	(25) 138	(23) 132	770
	(17) 163	(16) 177	(19) 147	(20) 130	(18) 119	736
	(2) 154	(1) 176	(4) 160	(5) 146	(3) 122	758
	807	895	804	737	675	3918

Antes de se proceder à análise de variância, para a qual é fácil obter as s. q. para Total, Repetições e Variedades, torna-se necessário formar a Tabela dos totais por variedades e, ainda, calcular as quantidades L e M (YATES, 1940) uma vez que as linhas e colunas não são ortogonais com as variedades. A expressão prática para o cálculo de L (e anàlogamente para M) é:

(Produção total das var. que figuram numa linha) — (r) × (Total da linha)

A seguir figuram os totais por variedades, e exemplifica-se o cálculo de L na Repetição II:

1	2	3	4	5	
474	444	437	428	426	2209
6	7	8	9	10	
505	470	445	478	453	2351
..	..	..	..	..	..
..	..	..	..	..	..
21	22	23	24	25	
480	422	461	447	460	2270
2341	2260	2171	2232	2245	11249

Quantidades L, Repetição II (linhas)

(18, 6, 12, 5, 24 = 2208) — 3 (693) = + 129
(7, 25, 1, 19, 13 = 2276) — 3 (720) = + 116
(15, 3, 9, 22, 16 = 2192) — 3 (687) = + 131
(4, 17, 23, 11, 10 = 2281) — 3 (716) = + 133
(21, 14, 20, 8, 2 = 2292) — 3 (773) = — 27
+ 482

As somas de quadrados para Linhas e Colunas, eliminando variedades, obteem-se agora fàcilmente, acumulando respectivamente os quadrados das quantidades L e M e dividindo esses totais por (k) $(k^2 - 1)/4 = 30$; os valores assim calculados figuram na Tabela VIII, obtendo-se o do Erro (24 g. l.) por diferença. Na última linha figura o valor relativo ao Erro, para 48 graus de liberdade.

Para se saber a *eficiência relativa* deste arranjo estatístico por comparação com o dos Blocos completos, calculam-se:

$$\lambda = \frac{2\,(151{,}91 - 108{,}62)}{4 \times 151{,}91} = 0{,}1425 \text{ e } \mu = \frac{(2\,875{,}87 - 108{,}62)}{4 \times 875{,}87} = 0{,}4380;$$

e sendo o erro padrão médio de cada total de variedades igual a:

$$\pm \sqrt{(3)\left(1 + \frac{0{,}1425 + 0{,}4380}{2}\right)(108{,}62)} = \pm \sqrt{(3)\ (140{,}12)} = \pm\ 20{,}5$$

e o do delineamento em Blocos completos: $\pm\sqrt{(3)(311,26)} = \pm 30,6$ virá finalmente:

$$(311,26)\ (100)\ /\ (140,12) = 220,4\ \%$$

O desvio padrão efectivo, em % da média geral deste ensaio, é de 7,9 %.

Vê-se, assim, que o erro experimental é pequeno, tanto mais que os talhões têm 2 filas de plantas, e, além disso, que o ajustamento pelas diferenças entre linhas e colunas, à parte certas perdas de informação que não excedem geralmente 3 %, produziu um aumento considerável de precisão.

TABELA VIII

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DUM «LATTICE» QUADRADO COM TALHÕES DE 2 LINHAS DE LARGURA (BATATAL DE SACAVÉM)

Origem da variação	g. l.	s. q.	q. m.
Repetições	2	2168,35	1084,18
Linhas, eliminando variedades	12	1822,95	151,91
Colunas, eliminando variedades . . .	12	10510,41	875,87
Variedades, ignorando linhas e colunas .	24	5320,32	221,68
Erro (por diferença)	24	2606,96	108,62
Total	74	22428,99	—
Erro (Blocos completos)	48	14940,32	311,26

Nos delineamentos em que $b = v$, YOUDEN, (1937) mostrou que as variedades nos blocos se podem arranjar numa ordem tal que cada uma delas ocorra uma única vez em cada posição do bloco. Para tais esquemas, na análise de variância eliminam-se do erro as diferenças verificadas entre aquelas posições. Note-se que cada uma destas posições compreende uma repetição completa.

Este autor estudou um ensaio com 21 tratamentos (constituidos por outras tantas soluções de «virus») aplicados a 21 plantas de *Nicotiana glutinosa* L. Estas plantas, que figuram de blocos incompletos, apresentam notável diferença entre as folhas, conforme as posições destas e, por isso, o *quadrado de YOUDEN* tem aqui

uma óptima aplicação: cada uma das soluções de virus é ensaiada em cada uma das 5 posições gerais das folhas, comuns a todas as plantas. A disposição do delineamento é de natureza tal que, finalmente, a cada posição geral corresponde uma repetição completa.

Aos dados do ensaio de uniformidade de tremôço doce, com talhões de 10 metros de comprimento, sobrepôs-se um quadrado de YOUDEN, seguindo-se fielmente as suas indicações (1937) que preconizam um arranjo como uma «forma modificada» dos esquemas de YATES (1936b); supor-se-á que $v = 31$ variedades, e que há 6 repetições.

Usando as mesmas notações do citado autor, as 6 repetições, antes da casualização dos blocos incompletos e das repetições, têm a seguinte disposição:

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z a b c d e
F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z a b c d e A B C D E
G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z a b c d e A B C D E F
I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z a b c d e A B C D E F G H
P Q R S T U V W X Y Z a b c d e A B C D E F G H I J K L M N O
T U V W X Y Z a b c d e A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S

O primeiro bloco incompleto contém os tratamentos A, F, G, I, P, T e, o segundo: B, G, H, J, Q, U; etc. Antes de se fazer a análise de variância é necessário formar uma Tabela análoga à Tabela V, apenas com modificação da última coluna, para a qual se usaria a fórmula: $kV - sB$. Nessa Tabela (que não daremos aqui) a soma algébrica dos números dessa coluna é, também, zero.

TABELA IX

ANÁLISE DE VARIÂNCIA DUM QUADRADO DE YOUDEN PARA 31 TRATAMENTOS E 6 REPETIÇÕES (TREMOÇAL COM LINHAS DE 10 M DE COMPRIMENTO)

Origem da variação	g. l.	s. q.	q. m.	d. p.
Repetições	5	601298,15	120259,63	
Blocos	30	123492,79	4116,43	
Tratamentos	30	38713,01	1290,43	
Erro (por diferença)	120	165648,01	1380,40	37,154
Total	185	929151,96	—	

Para a análise de variância, os valores das s. q. para Total, Repetições e Blocos calculam-se como é usual; para Variedades acumulam-se os quadrados dos números da referida coluna e dividem-se por $N = 186$, obtendo-se então o valor: 38713,01.

O ensaio não é significativo para tratamentos, como era de esperar, visto tratar-se dum ensaio de uniformidade.

Nas Tabelas de FISHER and YATES (1943) figuram as soluções dos vários quadrados de YOUDEN, alguns dos quais serão de grande interesse prático, quer em estudos como o referido, ou como os de dietas em animais, quer para ensaios de estufa ou campo. Para certos ensaios de campo, todavia, tal delineamento não será de aconselhar, pois obrigaria a dispor os talhões, ou os blocos, em faixas demasiado longas.

3. RESULTADOS DAS EFICIÊNCIAS DOS DELINEAMENTOS DE BLOCOS INCOMPLETOS

Em dois ensaios de uniformidade foram sucessivamente sobrepostos os diversos arranjos estatísticos de blocos incompletos a que nos temos referido, sendo então calculadas as respectivas eficiências atribuindo aos dos blocos completos a eficiência padrão 100. Apenas se considerou o caso dos talhões terem 5 m de comprimento e largura para 1 fila de plantas, dada a escassês do material de campo dos nossos dois ensaios de uniformidade que apenas permitem certos tipos de blocos.

Para o primeiro ensaio de uniformidade os resultados da produção de 400 filas de plantas de *Lupinus luteus* L. dispostas em 10 séries, foram já objecto dum outro estudo estatístico (OLIVEIRA, 1945), no qual se justificava a opinião de que eram de valor restrito; no presente trabalho apenas se utilizaram 320 filas correspondentes a 8 séries (Quadro A).

Quanto às produções, expressas em decagramas, do ensaio de uniformidade do batatal do ano agrícola 1945/46, o conjunto de 200 filas de plantas (cada uma com 5 m e espaçadas 0,50 m) distribuia-se por 5 séries (Quadro B). Tratava-se dum campo na «Várzea» da Estação Agronómica Nacional (Sacavém), cultivado com a variedade designada comercialmente por «Batata Duas-Vezes».

Na sobreposição dos esquemas estatísticos seguiu-se o princípio de tornar cada bloco incompleto o mais possível homogéneo. Por vezes adoptaram-se certos artifícios na junção dos talhões que deviam formar os blocos. Eis a Tabela com as eficiências relativas, considerando-se apenas o caso que inclui a informação inter-blocos, que é hoje mais usual.

TABELA X

EFICIÊNCIAS RELATIVAS, EM %, DOS ARRANJOS DE BLOCOS INCOMPLETOS EM RELAÇÃO AOS DE BLOCOS COMPLETOS, COM RECUPERAÇÃO DA INFORMAÇÃO INTER-BLOCOS

Ensaio de uniformidade com *Lupinus luteus* L. em linhas de 5 metros (Sacavém)

Traçados estatísticos	Número de variedades			
	25	49	64	Média
Lattice simples	289 (4)	216 (4)	165 (4)	223
Lattice triplo	318 (6)	224 (6)	202 (3)	248
Lattice quadrado	285 (3)	243 (4)	241 (3)	256
Bl. incompletos equilibrados . .	279 (6)	—	—	279
Lattice cúbico	—	—	155 (3)	155
	Média aproximada: 238			

Ensaio de uniformidade com batatas em linhas de 5 metros (Sacavém)

Traçados estatísticos	Número de variedades			
	35	49	64	Média
Lattice simples	159 (4)	142 (4)	136 (4)	146
Lattice triplo	160 (6)	142 (6)	126 (3)	143
Lattice quadrado	178 (3)	176 (4)	174 (3)	176
Bl. incompletos equilibrados . .	156 (6)	—	—	156
Lattice cúbico	—	—	147 (3)	147
	Média aproximada: 154			

NOTA — Os valores das eficiências para 25 variedades são médias de 2 traçados; os restantes valores dizem respeito apenas a 1 traçado. Entre parêntesis figura o n.º de repetições para cada traçado.

Nesta Tabela nota-se grande diferença, de 84 %, entre as médias gerais dos delineamentos sobrepostos aos ensaios de uniformidade. A média mais elevada, 238 %, dos arranjos estatísticos com *Lupinus luteus* L. denota, possìvelmente, a grande vantagem do uso de esquemas de blocos incompletos em relação aos de blocos completos, em terrenos de certa heterogeneidade, como vimos ser o do campo que levara tremôço doce (OLIVEIRA, 1945).

Para cada ensaio de uniformidade regista-se o seguinte facto, a confirmar o que tem sido dito: que a eficiência decresce à medida que o tamanho do bloco aumenta com o número crescente de talhões incluidos, isto é, os esquemas com blocos (incompletos) de 5 talhões darão maior eficiência do que os que contenham 7 ou 8. Todas estas asserções são feitas sob reserva, pelo facto de as áreas abrangidas não serem as mesmas, outro tanto acontecendo com o número de repetições; mas o facto é bastante visível na Tabela X, particularmente com o *«lattice» simples*, em que há número igual de repetições para 25, 49 e 64 variedades.

Quanto aos *«lattices»* entre si, *demarca-se fortemente o «lattice» quadrado* dada a vantagem de, por meio de tal delineamento, se fazer o contrôle da heterogeneidade do solo em dois sentidos. Àcerca do *«lattice» cúbico* temos poucos elementos, mas não parece que não seja também eficiente; já se disse que este delineamento é sobremaneira útil para ensaios comparativos com número de variedades muito grande.

Para 25 variedades o traçado com blocos incompletos equilibrados não se mostra inferior aos restantes; para 49 e 64 variedades os nossos ensaios de uniformidade não comportavam as repetições exigidas (8 e 9 respectivamente) e, por conseguinte, não se pode tirar aqui qualquer conclusão acerca das suas eficiências.

4. DISCUSSÃO

Viu-se como, a partir de 1936, se desenvolveram novos métodos para delinear e interpretar ensaios comparativos com grande número de variedades ou formas cultivadas, que permitem extrair uma melhor informação e, ao mesmo tempo, corrigir as médias dos efeitos da desigual fertilidade do terreno. O antigo processo de usar Blocos com variedades testemunhas intercaladas sistemàticamente

mostra-se de menor alcance e validade (YATES, 1936a; CALVET *et al.*, 1943).

As possibilidades daqueles delineamentos são imensas e alguns tipos têm-se mostrado já de grande interesse. Sobrepondo-os a ensaios de uniformidade com laranjais, cana sacarina, beterraba, cevada e batatas YATES, na Inglaterra, e GOULDEN, no Canadá, comprovaram essas vantagens. Este último autor obteve com trigos ganhos de precisão de 70 a 90 %.

Posteriormente, dezenas de ensaios de campo e laboratório têm sido executados segundo os novos esquemas que, duma maneira geral, se mostraram altamente eficientes. Em Portugal esses delineamentos foram introduzidos pelo colega F. CARVALHO ARAÚJO em 1942. COCHRAN (1941) relatou as conclusões de 93 *«lattices» triplos* e *«lattices» quadrados* com milhos, nos seguintes termos:

> «Para os *«lattices» triplos*, em Iowa, 3 repetições foram, em média, de pouco maior precisão do que 5 repetições com os blocos completos» ... «Para os *«lattices» quadrados* os aumentos de precisão representavam: um ganho de cerca de 1 repetição em 6, para 25 variedades; uma em cinco, com 49 ou 81 variedades; e 1 em 3, para 121 variedades».

Também se realizaram ensaios com aveias. ZUBER (1942) usou quatro tipos de *«lattices»* para 25, 49, 81 e 121 variedades fictícias e obteve um ganho médio de precisão, de 36 %, com recuperação da informação inter-blocos. No artigo de WELHAUSEN (1943) referem-se ganhos substanciais, quer com os *«lattices» equilibrados*, quer com *«lattices» quadrados*.

Com os nossos ensaios de uniformidade os ganhos foram também apreciáveis, principalmente com o de *Lupinus luteus* L., destacando-se, sobremaneira, o *«lattice» quadrado;* deve dizer-se, entretanto, que as conclusões referentes ao batatal são para nós as de maior interesse, pelas razões já atrás apontadas. Convém não esquecer todas as limitações inerentes a resultados dum só ano, local, e tipo de talhão aqui empregado (constituido por uma única linha, com 5 metros de comprimento, dada a escassês de dados para outros tipos e formas).

Antes de terminar queremos pôr em relevo ainda o seguinte: As conclusões relativas a ensaios comparativos de campo com um grande número de tratamentos ou variedades devem tomar-se com certas restrições, pois há inúmeros factores, quer intrínsecos, (quanto à natureza dos tratamentos ou variedades usadas ou, ainda, origem ou qualidade da semente, etc.) quer extrínsecos (como sejam os efeitos do solo e das técnicas culturais, épocas e densidades das sementeiras, condições climáticas, ataque de pragas, etc.) que tanto condicionam o pêso da colheita final.

Por tais considerações se vê a necessidade de repetir os ensaios nas zonas típicas do País e em vários anos, incluindo em cada esquema estatístico apenas aquelas variedades de que já se tenha um certo conhecimento prévio e não sejam ecològicamente muito distintas; convirá, ainda, usar mais de uma variável estatística, isto é, lançar mão da técnica da análise de covariância (GOULDEN, 1943; CORNISH, 1940).

E, como exemplo, citaremos os «Iowa Corn Tests», tão bem organizados, que, desde 1936, mantem vários campos experimentais, tendo-se prèviamente dividido o Estado de Iowa em 4 grandes secções, cada uma com 3 distritos. Em 1941 diversas formas cultivadas foram ensaiadas em 12 *«lattices» triplos*, cada um com 9 repetições, em todo o Estado de Iowa, obtendo-se um «performance score» da média de 5 anos, à custa das 5 variáveis: produção, conteudo em matéria sêca do grão, resistência à acama, número de maçarocas por planta e % de grãos deteriorados.

Também os dados de cada ano e de cada ensaio devem merecer atenção especial, a fim de atender à possível heterogeneidade do erro experimental, etc. Para o caso em que «falhe» um ou mais talhões, a técnica estatística adequada (CORNISH, 1943) evita muitas vezes o não se perder o ensaio, como acontecia outrora.

Quanto ao emprêgo do delineamento apropriado para cada caso, isso depende da natureza do ensaio ou questão proposta e, ainda, dos diversos factores, materiais ou não, limitantes: terreno disponível e consequente número de repetições, pessoal adestrado, dinheiro... Em face do número de variedades, v, e do número de repetições, r, não é difícil dizer qual o delineamento apropriado consultando a Tabela que vem no livro de GOULDEN, devendo preferir-se os arranjos equilibrados.

Duma maneira geral, entre 13 e 31 variedades, usar-se-ão os

blocos incompletos equilibrados; entre 73 e 121, os delineamentos a duas dimensões; e acima de 211 variedades, os *«lattices» cúbicos.* Nos casos intermédios podem empregar-se ora uns, ora outros, tendo, porém, em conta as limitações derivadas da possibilidade de repetição e da indicação dos casos tabelares.

SUMMARY

The importance of the incomplete block designs over the randomized complete blocks involving a large number of varieties is mentioned. Most of these new designs are named Pseudo-Factorials since their structure can be derived from confounded factorial designs. The construction of those designs is presented by numerical examples on uniformity trials.

Five incomplete block designs: the lattice, triple lattice, lattice square, cubic lattice and balanced incomplete block were applied to uniformity trials of *Lupinus luteus* L. and potatoes, assuming 25, 49 and 64 varieties, and using plots 5 meter long. All designs showed an average gain of 96 % in precision when inter-block information was recuperated (Table X), saving small losses due to inaccuracies on weighting.

On uniformity trial of *Lupinus luteus* L. an average gain of 138 % was obtained for all designs, and lattice square seems to be the best. On potatoes the gain was of 54 %, and lattice square gives 76 % of an average gain in precision, that is, it saves about 2 replications in 4. For balanced incomplete block and cubic lattice our data were insufficient for complete conclusions, therefore it seems to be also efficient and profitable.

An explanation about field difficulties on using these incomplete block designs or other complex designs is given, and attention is called to restrict importance of conclusions when a large number of varieties or treatments is tested. References on litterature for analysis of covariance and missing plot technique are given.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CALVET, R. P., ZULUETA, M. M. y ANÓS, A.

1943 *Experimentación Agrícola.* I. N. I. Agronómicas, Madrid.

CARVALHO, M. J. R. DE

1945 Estatística. Métodos modernos aplicáveis aos ensaios de campo. *Relat. fin. Curso Eng. Agrón.*. I. S. A., Lisboa.

COCHRAN, W. G.

1941 An examination of accuracy of lattice and lattice square experiments on corn. *Res. Bull. Ia. agric. Exp. Sta.* **289**.

1943 Some additional lattice square designs. *Res. Bull. Ia. agric. Exp. Sta.* **318**.

CORNISH, E. A.

1940 The analysis of covariance in quasi-factorial designs. *Ann. Eugen., Cambridge* **10**: 269-279.

1943 The recovery of inter-block information in quasi-factorial designs with incomplete data. I = Square, triple and cubic lattices. *Bull. Counc. Sci. and Ind. Res.* **158**.

COX, G. M., ECKHARDT, R. C. and COCHRAN, W. G.

1940 The analysis of lattice and triple lattice experiments in corn varietal tests. I — Construction and numerical analysis. II — Mathematical theory (by COCHRAN, W. G.) *Res. Bull. Ia. agric. Exp. Sta.* **281**.

COX, G. M.

1943 Modernised field designs at Rothamsted. *Proc. Soil Sci. Soc. Amer.* **8**: 20-22.

DAY, B. B. and AUSTIN, L.

1939 A three-dimensional lattice design for studies in forest genetics. *J. agric. Res.* **59**: 101-119.

FISHER, R. A. and YATES, F.

1943 *Statistical Tables for Biological Agricultural and Medical Research.* Oliver and Boyd Ltd., 2.nd Ed., London.

GOULDEN, C. H.

1943 *Methods of Statistical Analysis.* John Wiley & Sons Inc., New York.

OLIVEIRA, A. J. DE

1945 Ensaios de uniformidade. Estudo preliminar com *Lupinus luteus* L., em Sacavém. *Agron. Lusitana* **7**: 207-244.

STEVENS, W. L.

1939 The completely orthogonalized latin square. *Ann. Eugen., Cambridge* **9**: 82-93.

WADLEY, F. M.

1946 Incomplete block experimental designs in insect population problems. *J. econ. Ent.* **38**: 651-654.

WELHAUSEN, E. J.

1943 The accuracy of incomplete block designs in varietal trials in West Virginia. *J. Amer. Soc. Agron.* **35**: 66-76.

YATES, F.

1936a A new method of arranging varietal trials involving a large number of varieties. *J. agric. Sci.* **26**: 424-455.

YATES, F.

1936b Incomplete randomized bloks. *Ann. Eugen., Cambridge* **7**: 121-140.

1937 The analysis and design of factorial experiments. *Tech. Commun. Bur. Soil Sci., Harpenden* **35**.

1939 The recovery of inter-block information in variety trials arranged in three-dimensional lattices. *Ann. Eugen., Cambridge* **9**: 136-156.

1940 Lattices squares. *J. agric. Sci.* **30**: 672-687.

YOUDEN, W. J.

1937 Use of incomplete block replications in estimating tobacco-mosaic virus. *Contr. Boyce Thompson Inst.* **9**: 41-48.

ZUBER, M. S.

1942 Relative efficiency of incomplete block designs using corn uniformity trial data. *J. Amer. Soc. Agron.* **34**: 30-47.

INDICE DO VOLUME VIII

DE FLORA LUSITANA COMMENTARII. *Ad normam herbarii stationis agronomicae nationalis* 5

CONTRIBUTIONES AD MYCOFLORAM LUSITANIAE. *Centuria XII.* — E. de S. da Câmara 19

ESTUDOS DE ESTATÍSTICA AGRONÓMICA. *I. Teste de significância das diferenças entre coeficientes parciais da regressão entre proteína e glúten de trigos cultivados em várias localidades* — Augusto José de Oliveira 73

UM ESTUDO CITOLÓGICO DE *CUPRESSUS LUSITANICA* MILLER — A. Câmara e Alicinda de Jesus 95

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DA OLIVEIRA (*OLEA EUROPAEA* L.) — J. Vieira Natividade e J. M. Natividade Sanches Coelho 123

PROTEÍNAS DO TRIGO. *II. Sua variação e correlação com produção e pêso do hectolitro* — A. Pereira 131

ESTUDOS DE ESTATÍSTICA AGRONÓMICA. *II. Regressão múltipla da proteína com a produção e o peso do hectolitro de trigos cultivados em diversas localidades* — Augusto José de Oliveira 147

A ESTERILIDADE DO CENTEIO E AS SUAS RELAÇÕES COM O COMPRIMENTO DA ESPIGA E COM O VOLUME E PÊSO DOS CARIOPSES — Alberto Palyart do Carmo e Freitas 165

UM MÉTODO RÁPIDO DE DOSEAMENTO DO AZOTO. *Breve estudo sobre a sua adaptação à determinação da proteína no grão de trigo* — A. Pereira 205

O CRESCIMENTO DO TRONCO NAS PLANTAS NOVAS DA FORMA *BRANCA* DE *OLEA EUROPAEA* L. — Acúrcio Rodrigues 213

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO CITOLÓGICO DOS ESPELTOIDES DO TIPO γ — A. Câmara e Cândida Rodrigues 269

NOTA SOBRE OS *CORPOS M* DO TRICOGINIO E DO ANTERIDIO NAS *VENTURIA INAEQUALIS, V. PIRINA* E *V. ERIOBOTRYAE* — Branquinho D'Oliveira e Maria de Lourdes D'Oliveira 291

NOTAS ACERCA DO APARECIMENTO DA «DOENÇA DA TINTA» DO CASTANHEIRO NOS VIVEIROS DOS SERVIÇOS FLORESTAIS PORTUGUESES — António Augusto Lopes Pimentel 303

ESTUDOS DE ESTATÍSTICA AGRONÓMICA. *III. Eficiência relativa dos diversos delineamentos estatísticos usados na comparação de grande número de variedades. «Lattices» e «Blocos incompletos equilibrados»* — Augusto José de Oliveira 315

SUMÁRIO

Câmara, A. e Cândida Rodrigues — CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO CITOLÓGICO DOS ESPELTOIDES DO TIPO γ 269-290

D'Oliveira, Branquinho e Maria de Lourdes d'Oliveira — NOTA SOBRE OS CORPOS *M* DO TRICOGINIO E DO ANTERIDIO NAS *VENTURIA INAEQUALIS, V. PIRINA* E *V. ERIOBOTRYAE* . 291-301

Pimentel, António Augusto Lopes — NOTAS ACERCA DO APARECIMENTO DA «DOENÇA DA TINTA» DO CASTANHEIRO NOS VIVEIROS DOS SERVIÇOS FLORESTAIS PORTUGUESES . 303-313

Oliveira, Augusto José de — ESTUDOS DE ESTATÍSTICA AGRONÓMICA. III. EFICIÊNCIA RELATIVA DOS DIVERSOS DELINEAMENTOS ESTATÍSTICOS USADOS NA COMPARAÇÃO DE GRANDE NÚMERO DE VARIEDADES. «LATTICES» E «BLOCOS INCOMPLETOS EQUILIBRADOS» 315-340